

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-146183

(43) 公開日 平成10年(1998) 6月2日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>  
C 1 2 M 1/00  
// C 1 2 N 15/09  
C 1 2 Q 1/68

識別記号

Z N A

F I

C 1 2 M 1/00 A  
C 1 2 Q 1/68 A  
C 1 2 N 15/00 Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願平9-32413  
(22) 出願日 平成9年(1997) 2月17日  
(31) 優先権主張番号 特願平8-248333  
(32) 優先日 平8(1996) 9月19日  
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000003078  
株式会社東芝  
神奈川県川崎市幸区堀川町72番地  
(72) 発明者 橋本 幸二  
神奈川県川崎市幸区小向東芝町1番地 株  
式会社東芝研究開発センター内  
(72) 発明者 伊藤 桂子  
神奈川県川崎市幸区小向東芝町1番地 株  
式会社東芝研究開発センター内  
(72) 発明者 三代 俊治  
東京都港区芝浦1丁目1番1号 株式会社  
東芝本社事務所内  
(74) 代理人 弁理士 須山 佐一

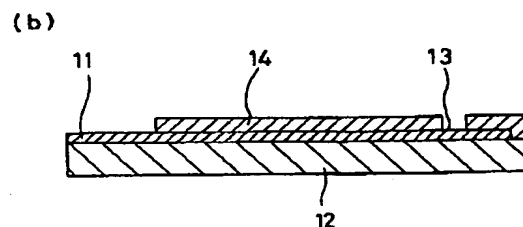
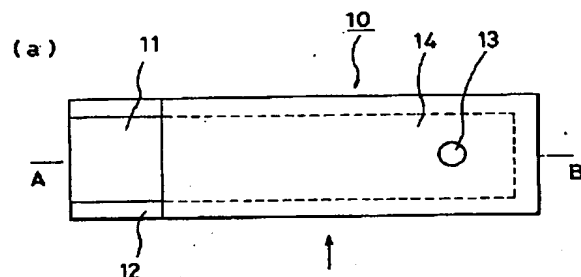
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 電極、検出装置およびセンサ

(57) 【要約】

【課題】 優れた再現性および定量性を発揮し、経済的に核酸を検出可能な電極、検出装置およびセンサを提供すること。

【解決手段】 核酸を固定化した電極、該電極を備えた検出装置およびセンサによる。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】 基板と、

前記基板上に配置した導電体と、  
前記導電体の表面を、外部に対する接続領域を確保しつつ被覆した絶縁体と、  
前記導電体を露出するよう前記絶縁体に設けた開口部と、  
前記開口部より露出した前記導電体に固定化した核酸と、を具備したことを特徴とする電極。

【請求項2】 基板と、前記基板上に配置した導電体と、前記導電体の表面を、外部に対する接続領域を確保しつつ被覆した絶縁体と、前記導電体を露出するよう前記絶縁体に設けた開口部と、前記開口部より露出した前記導電体に固定化した第1の核酸とを有する電極と、前記電極に固定化された第1の核酸と第2の核酸とを共存させ、設定した条件下でハイブリダイゼーションを実行する反応部と、前記電極に固定化された第1の核酸に電圧を印加する印加手段と、前記印加手段の動作によって生じた信号を測定する測定手段と、を具備したことを特徴とする検出装置。

【請求項3】 第1の核酸を、第2の核酸の検出に必要な最小の面積を有する領域内に固定化した電極と、前記電極に固定化された第1の核酸と前記第2の核酸とを共存させ、設定した条件下でハイブリダイゼーションを実行する反応部と、前記電極に固定化された第1の核酸に電圧を印加する印加手段と、前記印加手段の動作によって生じた信号を測定する測定手段と、を具備したことを特徴とする検出装置。

【請求項4】 第1の核酸を固定化した第1の電極と、第2の核酸を固定化するとともに、前記第1および前記第2の核酸に対して第3の核酸がハイブリッドを形成できるように配置された第2の電極と、前記第1および前記第2の電極に接続された電源と、前記電源の動作によって生じた信号を測定する測定手段と、を具備したことを特徴とする検出装置。

【請求項5】 第1の核酸を固定化した第1の電極と、第2の核酸を固定化するとともに、前記第1および前記第2の核酸に対して第3の核酸がハイブリッドを形成できるように配置された第2の電極と、を具備したことを特徴とするセンサ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、核酸を固定化した電極、核酸を固定化した電極を用いた検出装置および核酸を固定化した電極を用いたセンサに関する。

## 【0002】

【従来の技術】近年の分子生物学の進歩により、核酸の塩基配列と疾病との関係が明らかになってきた。そこ

で、特定の塩基配列あるいは特定の遺伝子の存在を検出することによって、発病の可能性や疾病の進行の程度等を探る遺伝子診断が、臨床検査の中で重要な位置を占めるようになってきた。

【0003】一般に、特定の塩基配列あるいは特定の遺伝子の存在を検出する電極は、導電体上にプローブとなる核酸を固定化した構成をとっており、特定の塩基配列あるいは特定の遺伝子の存在は、プローブとなる核酸と試料中の核酸との間で形成されたハイブリッドを電氣的あるいは光学的な信号を測定することで検出する。ところが、従来の電極は、ワイヤー状の電極を樹脂で抱埋した構造をとるために、電極、特に、導電体においてプローブとなる核酸を固定化する領域の表面積がばらつきやすい。さらに、物質の結晶構造は、その表面に固定化される他の物質の量に影響を与えることが知られているが、従来のワイヤー状の形態を有する電極では結晶構造を制御することができず、導電体上へ固定化されるプローブの量を制御することが困難である。したがって、導電体上へ固定化されるプローブの量の変動しやすく、核酸の検出に際し再現性が悪く、定量性にも劣るという問題があった。

【0004】また、近年、遺伝子診断の分野では検出感度の高感度化が進行しており、例えば、C型肝炎ウイルスの遺伝子診断では、治療あるいは疾病の進行状態の指標に用いる観点から、 $10^5 \sim 10^6$  copy/mL程度までの核酸を検出可能な感度が要求されている。同様に、HIVおよびHBV等のウイルスや細菌の検査あるいは癌遺伝子の検出等においても高い検出感度が求められており、さらなる高感度化が求められている。さらに、患者への負担を軽減するために、採取するサンプルの微量化が進行しており、血液電解質測定等では既に数マイクロリットルのサンプルから測定が行われている。

【0005】しかしながら、従来の電極を用いた検出装置およびセンサでは、電気化学的な活性を有する物質が電極の表面で直接反応したり、挿入剤や電気化学的な活性を有するラベル化剤を用いた場合には挿入剤やラベル化剤のプローブへの結合を防止できないため、バックグラウンドが大きくなってしまふ。したがって、存在量が $10^5$  copy/mL程度までの核酸が検出の限界であり(K. Hashimoto, Anal. Chem. 66, 3830, 1994)、PCR法のように酵素反応を用いた核酸の検出方法と比較すると検出感度が低いという問題があった。

【0006】さらに、上述したPCR法、酵素標識した核酸プローブと化学発光を組み合わせた方法あるいは挿入剤や電気化学的な活性を有するラベル化剤を用いて核酸を検出する方法を適用した検出装置およびセンサ等によれば、反応系が複雑なことから、核酸の検出に要する時間が長く、操作が煩雑であり、核酸の検出に要する経済的な負担も大きいという問題があった。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記従来例に鑑みてなされたもので、優れた再現性および定量性を発揮し、経済的に核酸を検出可能な電極を提供することを目的とする。

【0008】また、本発明は、核酸の検出に際し、優れた再現性および定量性を発揮するとともに、検出に要する時間の短縮と操作性の向上が図られた、検出時の経済性にも優れる検出装置を提供することを目的とする。

【0009】さらに、本発明は、核酸の検出に際し、優れた再現性および定量性を発揮するとともに、検出感度の高感度化が達成され、検出に要する時間の短縮と操作性の向上が図られた、検出時の経済性にも優れる検出装置を提供することを目的とする。

【0010】また、本発明は、核酸の検出に際し、優れた再現性および定量性を発揮するとともに、検出感度の高感度化が達成され、検出に要する時間の短縮と操作性の向上が図られた、検出時の経済性にも優れるセンサを提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】本願第1の発明に係る電極は、基板と、前記基板上に配置した導電体と、前記導電体の表面を、外部に対する接続領域を確保しつつ被覆した絶縁体と、前記導電体を露出するよう前記絶縁体に設けた開口部と、前記開口部より露出した前記導電体に固定化した核酸とを具備したことを特徴としている。

【0012】本願第1の発明における電極によれば、基板上に配置した導電体を被覆した絶縁体の一部に、導電体が露出するように開口部を設け、該開口部より露出した導電体に核酸を固定化したことにより、表面積が制御された導電体上へ核酸を固定化することができるので、固定化する核酸の量を制御することが可能となる。また、基板上に導電体を配置したことにより、導電体の特性を制御することができるので、導電体上に固定化する核酸の量を制御することが可能となる。

【0013】本願第1の発明に係る電極において、基板の材質はとくに限定されるものではなく、無機絶縁材料および有機材料等を用いることができる。無機絶縁材料としては、ガラス、石英ガラス、アルミナ、サファイア、フォスファイト、炭化ケイ素、酸化ケイ素、窒化ケイ素およびその他の金属酸化物等を挙げることができる。また、有機材料としては、ポリエチレン、エチレン、ポリプロピレン、ポリイソブチレン、ポリエチレンテレフタレート、不飽和ポリエステル、含フッ素樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、アクリル樹脂、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、アセタール樹脂、ポリカーボネート、ポリアミド、フェノール樹脂、ユリア樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂、スチレン・アクリロニトリル共重合体、アクリロニトリル・ブタジエンスチレン共重合体、シリコーン樹脂、ポ

リフェニレンオキサイドおよびポリスルホン等を挙げることができる。

【0014】また、基板上に配置する導電体の材質としては、金が好ましいが、その他の材質も使用可能である。例えば、金の合金、銀、プラチナ、水銀、ニッケル、パラジウム、シリコン、ゲルマニウム、ガリウムおよびタングステン等の金属単体またはそれらの合金、グラファイト、グラシーカーボン等の炭素やこれらの酸化物もしくは化合物を挙げることができる。

【0015】さらに、基板上への導電体の配置は、蒸着、スパッタ、メッキおよび印刷等の方法により行うことができる。蒸着法としては、抵抗加熱法、高周波加熱法および電子ビーム加熱法等を挙げることができる。また、スパッタとしては、直流二極スパッタリング、バイアススパッタリング、非対称交流スパッタリング、ゲッタスパッタリングおよび高周波スパッタリング等を挙げることができる。

【0016】また、基板上へ配置する導電体においては、結晶構造の(111)面の配向指数を大きくすることがより好ましく、これにより導電体上に固定化される核酸の量を制御することが可能となる。なお、配向指数は、ウィルソンの方法により、以下の式から求められる。

$$【0017】 \text{配向指数} (h \ k \ l) = IF(hkl) / IFR(hkl)$$

ここで、 $hkl$ は面指数、 $IF(hkl)$ は $(h \ k \ l)$ 面の相対強度、 $IFR(hkl)$ はASTMカードに記載されている標準金としての $IF(hkl)$ である。

【0018】本願第1の発明に係る電極においては、上記配向指数が1以上3以下であることが好ましく、2以上3以下であることがより好ましい。導電体の配向指数を高くするためには、例えば、導電体を蒸着またはスパッタリングで基板上に配置する場合、基板を加熱しておくことが有効である。加熱温度は特に限定されるものではないが、50℃以上500℃以下であることが好ましい。

【0019】また、基板上に導電体を配置する際、該基板と該導電体との間に、該導電体に用いた材質とは異なった材質からなる接着層を介在させ、導電体が接着層になじむように構成すると、導電体の安定性を向上させることが可能となる。接着層の材質としては、チタン、クロム、銅、ニッケルの単体、これら単体の合金およびこれら単体もしくは合金を組み合わせたものを挙げることができる。この場合にも、導電体を蒸着またはスパッタリングで接着層上に配置する際、接着層を加熱しておくことが有効である。

【0020】さらに、絶縁体の材質としては、好ましくは樹脂、より好ましくはフォトリソマーおよびフォトレジストを挙げることができる。フォトレジストとして

は、光露光用フォトレジスト、遠紫外用フォトレジスト、X線用フォトレジストおよび電子線用フォトレジストを挙げることができる。光露光用フォトレジストとしては、環化ゴム、ポリけい皮酸およびノボラック樹脂等を主原料とするものを挙げることができる。遠紫外用フォトレジストとしては、環化ゴム、フェノール樹脂、ポリメチルイソプロピルケトン(PMIPK)およびポリメチルメタクリレート(PMMA)等を主原料とするものを挙げることができる。また、X線用レジストとしては、COPおよびメタルアクリレートを主原料とするものの他、薄膜ハンドブック(オーム社)に記載された、当該技術分野で知られているものを挙げることができる。さらに、電子線用レジストとしては、PMMAをはじめとする、上記ハンドブックに記載されたものを挙げることができる。なお、絶縁体の膜厚は絶縁性確保のために100オングストローム以上が好ましく、また、核酸の固定化のために1mm以下であることが好ましい。

【0021】さらに、導電体を露出するよう絶縁体に設けられた開口部は、導電体を絶縁体で被覆した後に、当該技術分野で知られているリソグラフィーを用いて形成できる。したがって、開口部の大きさ、換言すれば絶縁体より露出した導電体の表面積を制御することが可能となり、固定化された核酸の量を制御することができる。なお、絶縁体より露出した導電体の表面の形状は、曲率変化が連続する形状、例えば、円、楕円あるいは正六角形以上の多角形であることが望ましい。

【0022】リソグラフィーを行うに際し、絶縁体の好ましい態様の一つは上述したレジストである。従来、レジストは最終的に除去するのが一般的であるが、本願第1の発明である電極の場合には、絶縁体として電極の一部に用いることが可能であり、上述した耐水性の高い材質でなければならない。また、レジストの他、ケイ素、チタン、アルミニウム、亜鉛、鉛、カドミウム、タングステン、モリブデン、クロム、タンタル、ニッケル等の酸化物、窒化物および炭化物、またはその他の合金を用いて、スパッタ、蒸着またはCVD等の方法により薄膜を形成した後に、フォトリソグラフィー等のリソグラフィーを行うことで開口部のパターニングを行って、開口部の大きさ、換言すれば絶縁体より露出した導電体の表面積を制御することができる。

【0023】また、開口部に絶縁体より露出した導電体に対して核酸を固定化する場合には、導電体の表面を活性化処理を行うことが望ましい。この処理は、絶縁体の表面に存在する異物を除去し、絶縁体の表面を完全に暴露することにより、絶縁体の表面における自由エネルギーを増加させ、核酸の固定化を確実にする目的で行われる。具体的には、はじめに、導電体を脱イオン水で洗浄する。洗浄後、0.1~1.0Mの硫酸溶液中で-0.5~2V(vs Ag/AgCl)の範囲で、1~

100000V/sの範囲で電位を走査させる。なお、活性化は、硫酸の溶液だけでなく、混酸、王水、過塩素酸等を使用して行ってもよい。こうして表面が活性化された導電体に核酸を固定化するが、固定化に際し、核酸の5'または3'末端にチオール基を導入しておく。チオール化された核酸は、主としてチオール基の酸化を防ぐ観点から、DTT等の還元剤の存在する溶液中に保存される。DTT等の還元剤は、核酸の固定化の直前にゲル過又は酢酸エチルによる抽出操作等により除去される。チオール基を導入した核酸を、表面が活性化された導電体に固定化するには、イオン強度が0.01~5、pHが5~10の範囲内に調整された緩衝液中に核酸を溶解し、この緩衝液に活性化した直後の電極を浸漬することにより行う。導電体への核酸の固定化は、緩衝液の温度を4~100℃の範囲とし、10分から1晩放置して行う。チオール基は、金等の導電体の表面に吸着され、強い相互作用で固定化されるので、チオール基を導入した核酸は導電体の表面に強固に固定化されることとなる。導電体に固定化される核酸の量は、上述した緩衝液に溶解させる核酸の量を調整することにより制御されるが、一般的には、緩衝液中の核酸の最終濃度が1ng/ml~1mg/mlとなるように調整される。この条件のもとでは、核酸は導電体の表面に $10^9$ copy/cm<sup>2</sup>~ $10^{14}$ copy/cm<sup>2</sup>程度固定化される。核酸を固定化した電極は、DNaseやRNase等の核酸分解酵素(ヌクレアーゼ)が存在しない条件で保存し、好ましくは遮光することにより保存することができる。保存期間が比較的に短い場合には、ハイブリダイゼーション溶液、トリス-EDTA緩衝液(TE)または滅菌した脱イオン水中に浸して保存することが可能である。電極の保存温度は4℃以下が好ましいが、より好ましくは-20℃程度で保存する。なお、長期間にわたり電極を保存する場合には、固定化された核酸を安定に保つためにドライ条件下で保存することが好ましい。電極をドライにする方法としては、凍結乾燥や風乾等を挙げることができ、アルゴン等の不活性ガス、窒素または乾燥空気等の気相の下、あるいは真空状態の下で好適に実施することができる。

【0024】さらに、導電体の表面に固定化される核酸は、DNA(一本鎖)のほかRNA(一本鎖)でもよく、塩基数も限定されるものではない。しかしながら、特定の核酸をバックグラウンドを生じることなく確実に検出するために、核酸は15塩基~3000塩基程度の長さにすることが好ましい。また、導電体の表面に固定化される核酸の塩基配列は検出する核酸の塩基配列にたがって決定されるが、1種類の塩基配列だけでなく複数種類の塩基配列からなる核酸を導電体の表面に固定化することができる。検出する核酸としては、種々のウイルス、細菌、寄生虫および真菌等に由来する核酸や腫瘍をはじめとする種々の疾患を有する細胞に由来する核酸であってもよい。なお、検出する核酸は、種々のウイル

ス、細菌、寄生虫、真菌および腫瘍をはじめとする種々の疾患を有する細胞に由来する遺伝子や遺伝子の一部であってもよく、また、遺伝子以外の核酸であってもよい。ここで、遺伝子とは、ゲノム上のある長さをもった特定の区画（構造遺伝子）を指すものである。ウイルスとしては、肝炎ウイルス（A、B、C、D、E、FおよびG型）、ヒト免疫不全症ウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、ポリオマウイルス、パピローマウイルス、パルボウイルス、ムンプスウイルス、ロタウイルス、エンテロウイルス、日本脳炎ウイルス、デングウイルス、風疹ウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルス、サイトメガロウイルス等を挙げることができる。また、細菌および真菌としては、黄色ブドウ球菌、溶血性連鎖球菌、病原性大腸菌、腸炎ビブリオ菌、ヘリコバクターピロリ菌、カンピロバクター、コレラ菌、赤痢菌、サルモネラ菌、エルシニア、淋菌、リステリア菌、レプトスピラ、レジオネラ菌、スピロヘータ、肺炎マイコプラズマ、リッケチア、クラジミア、マラリア、赤痢アメーバおよび病原真菌等を挙げることができる。また、種々の疾患を有する細胞としては、網膜芽細胞腫、ウィルムス腫瘍、家族性大腸ポリポーシス、遺伝性ポリポーシス大腸癌、神経繊維腫症、家族性乳癌、色素性乾皮症、脳腫瘍、口腔癌、食道癌、胃癌、大腸癌、肝臓癌、膵臓癌、肺癌、甲状腺腫瘍、泌尿器腫瘍、男性器腫瘍、女性器腫瘍、皮膚腫瘍、骨・軟部腫瘍、白血病、リンパ腫、固形腫瘍に由来する細胞を挙げることができる。さらに、導電体の表面に固定化される核酸は、例えば、血液、血清、白血球、尿、便、精液、唾液、組織、培養細胞および喀痰等の試料から抽出してもよく、また、DNA合成機等により化学合成してもよい。上記試料から核酸を抽出する方法としては、特に限定されるものではなく、フェノールクロロホルム法等の液-液抽出法や、担体を用いる固-液抽出法を用いることができ、また、QIAmp（QIAGEN社製）やスマイテスト（住友金属社製）等の市販の核酸抽出キットを用いることも可能である。

【0025】本願第1の発明による電極は、核酸の検出が必要であるならば、種々の疾患や疾病の進行の程度を検出する医療分野のみならず、例えば、食品検査、検査、医薬品検査、法医学、農業、畜産、漁業および林業等の全ての分野に適用することができる。

【0026】また、本願第2の発明に係る検出装置は、基板と、前記基板上に配置した導電体と、前記導電体の表面を、外部に対する接続領域を確保しつつ被覆した絶縁体と、前記導電体を露出するよう前記絶縁体に設けた開口部と、前記開口部より露出した前記導電体に固定化した第1の核酸とを有する電極と、前記電極に固定化された第1の核酸と第2の核酸とを共存させ、設定した条件下でハイブリダイゼーションを実行する反応部と、前記電極に固定化された第1の核酸に電圧を印加する印加

手段と、前記印加手段の動作によって生じた信号を測定する測定手段とを具備したことを特徴としている。

【0027】本願第2の発明における検出装置によれば、電極に定量的に固定化した第1の核酸と第2の核酸とを反応部でハイブリダイゼーションさせ、第1の核酸に電圧を印加して生じた信号を測定することにより、該信号の測定量と第2の核酸の量とを一義的に対応させることができるので、再現性および定量性に優れるとともに高い感度で第2の核酸を検出することが可能となる。また、検出に要する時間の短縮と操作性の向上が達成されるので、第2の核酸を経済的に検出することが可能となる。

【0028】本願第2の発明に係る検出装置において、電極は、上述した本願第1の発明に係る電極と同等のものである。

【0029】また、反応部は、電極に固定化された第1の核酸と第2の核酸とを共存させ、ハイブリダイゼーションを実行可能な構成をとるものであるならば、特に限定されないが、ハイブリダイゼーションは一般にイオン強度0.01~5、pH5~10の範囲の緩衝液を用い、10~90℃の温度で1分以上1晩程度反応させるので、緩衝液の蒸発を防止するとともに温度管理が可能な構造を有するものが好ましい。

【0030】さらに、電極に固定化された第1の核酸に電圧を印加する印加手段としては、該電極の第1の核酸を固定化した領域を作用極とし、該作用極に対応する対極を設け、作用極と対極との間に電圧を印加するように構成されていれば限定はされない。また、作用極と対極との他に、グラッドを基準系とする参照電極を設置してもよい。また、通常、作用極と対極とは液体を介して配置されており、該液体は核酸を分解するヌクレアーゼを含まず、第1の核酸に対する電圧の印加と後述する測定を妨げるものでなければ限定はされない。

【0031】また、印加手段の動作によって生じた信号を測定する測定手段としては、電流値、電気伝導度、電位、抵抗値、電気容量、インダクタンスおよびインピーダンス等の電気的な信号を検出する手段や、蛍光、化学発光および電気化学発光を検出する手段が挙げられる。核酸は、電圧を印加すると自身より発光するので、発光強度を測定することにより、電極に存在する核酸の量、換言すれば、第1の核酸とハイブリッド形成した第2の核酸の量を検出することができる。また、第2の核酸の検出に際し、電気的な信号を得るために、ヘキスト33258、アクリジンオレンジ、キナクリン、ドウノマイシン、メタロインターカラーター、ビスアクリジン等のビスインターカラーター、トリスインターカラーターおよびポリインターカラーター等の挿入剤、フィロセン類および金属錯体等の電気化学的に活性な物質により電極上の核酸を標識し、第1の核酸に電圧を印加することにより該電気化学的に活性な物質に由来する反応電流値等

の電気的な信号を検出して、第1の核酸とハイブリッド形成した第2の核酸の量を検出することができる。電気的な測定は、3電極タイプ（参照電極、対極、作用極）または2電極タイプ（対極、作用極）で行われ、挿入剤等が電氣的に反応するように電圧を印加し、挿入剤等に由来する電流値等を測定する。この際、電圧は定速で掃引するか、パルスで印加するか、又は定電圧を印加することができる。測定には、ポテンシオスタット、デジタルマルチメータ、ファンクションジェネレータ等の装置を用いて電流や電圧を制御する。そして、得られた電流値等をもとに、検量線から第2の核酸の濃度を算出する。また、第2の核酸の検出に際し、光学的な信号を増幅するために発光物質および蛍光物質を添加してもよい。蛍光物質としては、ヘキスト33258、アクリジンオレンジ、キナクリン、ドウノマイシン、メタロインターカラーター、ビスアクリジン等のビスインターカラーター、トリスインターカラーターおよびポリインターカラーター等の挿入剤を挙げることができる。これらの挿入剤は、紫外線等の照射により蛍光を発する。また、ローダミン、フルオレッセイン類等の蛍光物質やルシフェリン、アクリジニウムエステル類等の発光物質により第2の核酸を標識し、紫外線等の照射や酵素等を添加することにより光子を発生させ、第1の核酸とハイブリッド形成した第2の核酸の量を検出することができる。さらに、ルシゲニンおよびルテニウム錯体等の電気化学発光物質で第2の核酸を標識して発光させることにより、第1の核酸とハイブリッド形成した第2の核酸の量を検出することができる。また、アルカリフォスファターゼやパーオキシダーゼ等を用いて、第1の核酸とハイブリッド形成した第2の核酸の量を検出することができる。また、標識に際し、挿入剤、発光物質、電気化学発光物質、蛍光物質および酵素の濃度はその種類により異なるが、一般には $1\text{ ng/ml} \sim 1\text{ mg/ml}$ の範囲で使用する。このとき、標識は、イオン強度 $0.01 \sim 5$ 、 $\text{pH} 5$ から $10$ の範囲の緩衝液を用いて行うとよい。したがって、測定手段は、必要に応じ最適なものが単独あるいは組み合わされて用いられる。なお、挿入剤、発光物質、電気化学、発光物質、蛍光物質等の標識剤の非特異吸着を抑制するために、第1の核酸の固定化後あるいは固定化時に、第1の核酸を固定化する領域の表面を何らかの物質で被覆することが望ましい。該物質は、特に限定される物ではないが、センサが金からなる場合には、チオール化合物であることがより望ましい。チオール化合物としては、チオール化核酸を用いることができる。チオール化核酸にはヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、ヌクレオシド、デオキシヌクレオシドがあり、アデニン、チミン、ヒポキサンチン、キサンチン、シトシン、グアニン、ウラシル、イノシン、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジンおよびリボチミジンまたはこれらのオリゴマー等を挙げることができ

る。また、ジチオスレイトール、ジチオビスベンゼン安息香酸およびアルカンチオールメルカプトエタノール等のチオール化合物も用いることができる。該物質で第1の核酸を固定化する領域の表面を被覆すると、該領域に対する標識剤の非特異的な吸着が抑制され、 $S/N$ が向上することになる。また、印加手段を動作させ、生じた信号を測定手段により測定をする場合には、バックグラウンドを低減する目的からハイブリダイゼーション後の電極をハイブリダイゼーション溶液や滅菌水等で洗浄することが好ましい。

【0032】さらに、本願第3の発明に係る検出装置は、第1の核酸を、第2の核酸の検出に必要な最小の面積を有する領域内に固定化した電極と、前記電極に固定化された第1の核酸と前記第2の核酸とを共存させ、設定した条件下でハイブリダイゼーションを実行する反応部と、前記電極に固定化された第1の核酸に電圧を印加する印加手段と、前記印加手段の動作によって生じた信号を測定する測定手段とを具備したことを特徴としている。

【0033】本願第3の発明における検出装置によれば、第2の核酸の検出に必要な最小の面積を有する領域内に定量的に固定化した第1の核酸と第2の核酸とを反応部でハイブリダイゼーションさせ、第1の核酸に電圧を印加して生じた信号を測定することにより、該信号の測定量と第2の核酸の量とを一義的に対応させるとともにバックグラウンドを低減することができるので、再現性および定量性に優れるとともに高い感度で第2の核酸を検出することが可能となる。また、検出に要する時間の短縮と操作性の向上が達成されるので、第2の核酸を経済的に検出することが可能となる。

【0034】上述したように、現在、C型肝炎ウイルスの検査では、治療の指標に最低でも $10^5 \text{ copy/mL}$ の感度が要求されている。また、HIVやHBV等の検査あるいは細菌感染症、癌遺伝子等の検出でも同等あるいはそれ以上の高い検出感度が求められている。一般に、核酸の検出をハイブリッド形成を行って実行する検出装置では、挿入剤、光学的および電気化学的に活性な標識物質等が電極の表面で直接反応してしまったり、挿入剤や光学的、電気化学的に活性な標識物質等が電極に固定化された核酸（プローブ）に結合してしまうことで、バックグラウンドが大きくなってしまふ。したがって、非特異的な信号（バックグラウンド）により核酸の検出感度を低下させる原因となっている。核酸の検出感度を向上させるためには、非特異的な信号（バックグラウンド）を低減させ、ハイブリッドの形成に由来する特異的な信号のみを測定することが重要である。すなわち、電極上で形成したハイブリッドに由来する特異的な信号だけを確実に検出できれば、核酸の検出に関して高感度化が期待できる。上述した非特異的な信号を低減するためには、挿入剤、光学的および電気化学的に活性な標識物質等が電極

の表面で直接反応してしまったり、挿入剤や光学的、電気化学的に活性な標識物質等が電極に固定化された核酸（プローブ）に結合することを抑制すればよい。そして、該抑制を達成するためには、核酸を固定化する領域の面積を小さくすることが有効になる。すなわち、核酸を固定化する領域の面積を小さくすることで、挿入剤、光学的および電気化学的に活性な標識物質等が電極の表面、特に、核酸を固定化する領域に非特異的に結合する量を減少させるとともに、電極に固定化される核酸の量も減少することから、結果として、核酸に非特異的に結合する挿入剤、光学的および電気化学的に活性な標識物質等の量も減少することになる。したがって、核酸を固定化する領域の面積を小さくするだけで、挿入剤等に由来する非特異的な信号を抑制できることになる。ここで、基礎的解析より、電気化学的な反応を用いた核酸の検出方法における検出感度と核酸を固定化する領域の面積との関係は、式（1）で示されることが判明した。

$$【0035】 y = 0.72x + 8.0 \cdots (1)$$

ここで、 $y$ は核酸を固定化する領域の面積（ $\text{cm}^2$ ）の対数、 $x$ は検出感度（ $\text{copy}/\text{mL}$ ）の対数である。

【0036】よって、式（1）より、例えば、 $10^5 \text{ copy}/\text{mL}$ 以下の核酸の検出を達成するためには、電極に核酸を固定化する領域の面積を $7 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$ 以下にする必要がある。このように、式（1）より、第2の核酸の検出限界を設定することにより、第1の核酸を固定化するために必要な最小の面積を算出することができる。ところで、上述したような微小な領域を均一に作製する手段として、フォトリソグラフィーが利用できる。式（1）から明らかなように、検出感度を向上させるためには、第1の核酸を固定化する領域の面積を更に微小にする必要がある。しかしながら、フォトリソグラフィーを用いても、 $10^{-8} \text{ cm}^2$ 以下の領域を再現性よく作製することは困難であり、場合によっては再現性が低下することもある。したがって、第1の核酸を固定化する領域の面積は $10^{-8} \text{ cm}^2$ 以上であることが望ましい。ここで、第1の核酸を固定化する領域の面積を小さくすると、電極に固定化される核酸（プローブ）の量が減るので、ハイブリダイゼーションに要する反応時間が短い場合には特異的なハイブリッドの形成が少なくなり、得られる信号の絶対量も減少する可能性がある。この場合には、ハイブリダイゼーションを行う時間を長くすることで信号の絶対量を確保することができる。

【0037】本願第3の発明に係る検出装置において、電極は、第1の核酸を固定化する領域の面積が、第2の核酸の検出限界に対応して求められた面積を有してさえいれば特に限定はされず、例えば、本願第1の発明に係る電極の構成をとることが可能である。また、反応部、印加手段および測定手段については、上述した本願第2の発明に係る検出装置と同様の構成および手法をとることができる。

【0038】また、本願第4の発明に係る検出装置は、第1の核酸を固定化した第1の電極と、第2の核酸を固定化するとともに、前記第1および前記第2の核酸に対して第3の核酸がハイブリッドを形成できるように配置された第2の電極と、前記第1および前記第2の電極に接続された電源と、前記電源の動作によって生じた信号を測定する測定手段とを具備したことを特徴としている。

【0039】本願第4の発明における検出装置によれば、第1および第2の核酸を固定化した第1および第2の電極を該第1および前記第2の核酸に対して第3の核酸がハイブリッドを形成できるように配置し、第1および第2の電極に接続された電源より電圧を印加して生じた信号を測定することにより、第3の核酸に由来する信号をバックグラウンドを低減しつつ確実に得ることができるので、再現性および定量性に優れるとともに高い感度で第3の核酸を検出することが可能となる。また、検出に要する時間の短縮と操作性の向上が達成されるので、第3の核酸を経済的に検出することが可能となる。

【0040】本願第4の発明における検出装置は、核酸を導電体とみなし、核酸に電圧をかけることにより生じる電流あるいは光子の放出（発光）を検出して第3の核酸を検出しようとしたものである。すなわち、第3の核酸が第1および第2の核酸とハイブリッドを形成すると、ハイブリッドの形成部を通じて回路が構成される。ここに、第1および第2の電極に接続された電源より電圧を印加すると、第3の核酸を通じて電流が流れる。そこで、電流値、電気伝導度、電位、抵抗値、電気容量、インダクタンスおよびインピーダンス等の電気的な信号を検出すれば、第3の核酸に由来する信号のみを検出したことになる。また、第3の核酸を通じて電流が流れると、ハイブリッドを形成した第1、第2および第3の核酸より光子が放出され核酸が発光する。そこで、発光強度を測定すれば、第3の核酸に由来する信号を検出したことになる。したがって、電気的あるいは光学的な信号を測定することにより、再現性および定量性に優れるとともに高い感度で第3の核酸を検出することが可能となる。

【0041】本願第4の発明に係る検出装置において、第1および第2の電極は、第1および第2の核酸を固定化されたものであれば限定されるものではないが、核酸の検出に際し再現性および定量性を向上させる目的から、本願第1の発明による電極や本願第2の発明に適用した電極を好適に用いることができる。さらに、バックグラウンドの発生を防止する観点から、本願第3の発明に適用した電極を好適に用いることができる。第1および第2の電極に固定化する第1および第2の核酸の配列は、各々1種類の塩基配列を示すものでもよいし、複数種類の塩基配列からなるものでもよい。また、一般的には、第1および第2の核酸の配列は異なるように選択す

るが、第1および第2の核酸の配列を同じにしてもよい。第1および第2の電極の位置関係は、第3の核酸とハイブリッドを形成可能な位置に配置されていれば限定されないが、安定したハイブリッドの形成を促すために対向して配置することが望ましい。第1および第2の電極を対向して配置した場合、第1および第2の電極の間隔は第3の核酸の長さに依存して決定される。すなわち、第3の核酸は、第1および第2の核酸の双方と端部（5'端および3'端）の領域でハイブリッドを形成するので、第1、第2および第3の核酸の長さをA、BおよびCとすれば、第1および第2の電極の間隔Lは、 $C + 2\alpha \leq L < A + B + C + 2\alpha$ （ $\alpha$ は第1および第2の核酸に導入されたチオール基等による余剰の長さ）の範囲となるように設定される。しかしながら、第1および第2の核酸に第3の核酸が安定して結合するためには、第1および第2の核酸と第3の核酸とが5〜30塩基程度に渡ってハイブリッドを形成する必要があり、また、第1および第2の核酸においてハイブリッドを形成する領域が30塩基を越えると非特異的なハイブリッドの形成を引き起こす可能性が高くなることから、第1および第2の電極の間隔Lは $L = A + B + C + 2\alpha - (10 \text{ 塩基} \sim 60 \text{ 塩基の長さ})$ の範囲で調整されることが望ましい。具体的には、第1および第2の電極の間隔Lは10nm〜1mm、好ましくは、50nm〜1μm程度に設定される。また、第1および第2の核酸と第3の核酸とがハイブリッドを形成するように第1および第2の電極を配置するためには、例えば、第1および第2の電極をキャピラリーの内部にフォトリソグラフィを用いて作り込むようにするとよい。このような構成によれば、第1および第2の電極を配置したキャピラリーの内部でハイブリダイゼーションを行うことができ、ハイブリダイゼーション後における第1および第2の電極の洗浄や、第1および第2の電極に接続された電源より電圧を印加して生じた信号の測定も容易に行うことができる。さらに、前記第1および前記第2の電極に接続された電源としては、第1および第2の核酸とハイブリッドの形成が行われた第3の核酸に電圧を印加できるものであれば特に限定はされない。また、電源の動作によって生じた信号を測定する測定手段としては、上述した本願第2および第3の発明に係る検出装置と同様の構成および手法をとることができる。

【0042】さらに、本願第5の発明に係るセンサは、第1の核酸を固定化した第1の電極と、第2の核酸を固定化するとともに、前記第1および前記第2の核酸に対して第3の核酸がハイブリッドを形成できるように配置された第2の電極とを具備したことを特徴としている。

【0043】本願第5の発明におけるセンサによれば、第1および第2の核酸を固定化した第1および第2の電極を、第1および第2の核酸に対して第3の核酸がハイブリッドを形成できるように配置したことにより、第1

および第2の核酸に対して第3の核酸が安定したハイブリッドを容易に形成することが可能となる。

【0044】本願第5の発明におけるセンサにおいて、第1および第2の電極は、第1および第2の核酸を固定化されたものであれば限定されるものではないが、核酸の検出に際し再現性および定量性を向上させる目的から、本願第1の発明による電極を好適に用いることができる。さらに、バックグラウンドの発生を防止する観点から、本願第3の発明に適用した電極を好適に用いることができる。また、第1および第2の電極の位置関係は、第1および第2の核酸に対し第3の核酸がハイブリッドを形成可能な位置に配置されていれば限定されないが、例えば、本願第4の発明に係る検出装置と同様の構成および手法をとることができる。

【0045】次に、検出の対象となる核酸の調整方法について説明する。

【0046】一般に、核酸の調整に際しては、全血、血清、白血球、細胞、組織、喀痰、尿、精液、唾液、種々の食品群、土壌、河川の水や海水等を試料として用いている。そして、いずれの場合でも、微量の核酸を効率よく抽出しなければならない。例えば、C型肝炎の検査等では血清1mL中に含まれる数個から数十個のウイルスの核酸を抽出しなければならない。また、病原性大腸菌O-157は数百個の細菌の存在で感染するので、食品等に付着した、わずかな細菌に由来する核酸を抽出しなければならない。通常、微量の核酸を抽出するためには、抽出効率をあげるため、キャリアとしてダミーの核酸、例えば、サケ精子DNAや牛胸腺DNA等を添加する。しかしながら、該DNAの塩基配列は完全には知られていないため、本願発明において検出の対象となる核酸と同じまたは類似の配列が含まれている可能性がある。キャリア核酸が導電体や電極に固定化された核酸（プローブ）と類似の配列を持つ場合には、検出対象となる核酸ではなく、添加したキャリア核酸が導電体や電極に固定化された核酸（プローブ）と反応してしまうことになる。したがって、実際には検出対象となる核酸が存在しない場合（陰性）であっても、誤って、検出対象となる核酸が存在する（陽性）との判定（偽陽性）を下してしまう。極めて低濃度に存在する核酸の検出が求められている現在、上記偽陽性の発生は大きな問題となる。また、核酸間でのハイブリッドの形成により核酸の検出をする際には、検出対象となる核酸自身のセルフハイブリダイゼーションによって、導電体や電極に固定化された核酸（プローブ）と検出対象となる核酸との反応が阻害されることが問題となる。すなわち、一部のウイルスを除いて核酸は互いに相補的に結合した二本鎖のDNAであるため、一度、熱またはアルカリにより一本鎖に解離させても、検出対象となる核酸はハイブリダイゼーションの際にプローブではなく、元の二本鎖のDNAに復元してしまうのである。この反応は、検出対象となる核酸



の量が比較的多い場合に起こりやすく、高濃度側の検出範囲を狭め定量性を低下させる要因となる。そこで、試料より核酸を抽出する際に、キャリア核酸として、既知の塩基配列からなる核酸、例えば、polyA、polyT等の合成したホモオリゴヌクレオチド、poly(AT)等をはじめとする合成したヘテロオリゴヌクレオチド、アデニン(A)、チミン(T)、グアニン(G)およびシトシン(C)がランダムに配列したオリゴヌクレオチド、一般に使用されているプラスミドやプラスミドの分解物等の核酸を0.1 ng/ml~100 ng/ml程度となるように添加して核酸の抽出を行うと、微量の核酸であっても効率よく試料より抽出することができる。ただし、上記方法にしたがって抽出した核酸を用いてハイブリダイゼーションを行う場合には、試料より核酸を抽出する際に添加する核酸の配列が、検出の際に使用する核酸(プローブ)の配列と相補的でないことを確認しておかなければならない。また、添加するキャリア核酸は一種類に限定されるわけではなく、一つの試料に複数種類のキャリア核酸を添加することができる。また、キャリア核酸の分子量も特に限定されるものではないが数塩基から数千塩基程度の範囲が好ましい。試料より核酸を抽出する方法は特に限定されるものではなく、フェノールククロホルム法等の液-液抽出法、担体を用いる固液抽出法あるいはQIAamp(QIAGEN社製)やスマイテスト(住友金属社製)等の市販のキットを利用することも可能である。

【0047】抽出した核酸は、本願発明のみならず、各種の用途に用いることができる。例えば、RIや蛍光物質で標識したプローブを用いたドットプロット法、サザンプロット法、ノーザンプロット法およびマイクロプレート法を挙げることができる。また、プローブ側を担体に固定化するタイプの検出法に用いることもできる。なお、本法により調整した核酸を本願発明の電極、センサあるいは検出装置を用いて検出する場合、検出の対象となる核酸は二本鎖であることが多く、この場合、検出の対象となる核酸間でのセルフハイブリダイゼーションにより導電体や電極上に固定化された核酸(プローブ)との反応が阻害されてしまう。しかし、試料より核酸を抽出する際に添加したキャリア核酸が検出の対象となる核酸の一部に相補的な配列または類似の配列を持てば、該配列の領域でキャリア核酸と検出の対象となる核酸との間でハイブリッドが形成され、検出の対象となる核酸間でのセルフハイブリダイゼーションを抑えることができる。このとき、キャリア核酸と検出の対象となる核酸との間での反応性を考慮して、キャリア核酸は数塩基から数十塩基程度の長さとするのが効果的である。なお、キャリア核酸は、導電体や電極上に固定化された核酸(プローブ)と検出の対象となる核酸間でのハイブリッドの形成を妨げることをないように選択されるのは当然である。このように、キャリア核酸の塩基配列を、検出の対

象となる核酸に相補的で、導電体や電極上に固定化された核酸等(プローブ)とはハイブリッドを形成しない配列に設定すれば、試料からの核酸の抽出の効率を高めるだけでなく、検出の対象となる核酸間でのハイブリッドの形成を抑えて定量的な核酸の検出を行うことが可能となる。上述した核酸の抽出方法は、電極、光ファイバーおよび水晶振動子等を用いた核酸の検出に適用すると非常に効果的である。電極、光ファイバーおよび水晶振動子等を用いた核酸の検出の原理は、これらに固定化された核酸(プローブ)によって検出の対象となる核酸が釣り上げられ、その後の状態変化(一本鎖から二本鎖への変化および重量の変化)を直接的あるいは間接的に測定して読み取ることである。そこで、検出の対象となる核酸と相補的な配列(電極、光ファイバーおよび水晶振動子等に固定化された核酸すなわちプローブとハイブリッドを形成する領域の配列を除く)を持つキャリア核酸を用いれば、釣り上げてきた検出の対象となる核酸の未反応部分(通常は一本鎖のまま)にキャリア核酸がハイブリダイズし部分的に二本鎖を形成する。その結果、電極、光ファイバーおよび水晶振動子上の核酸の状態を大きく変化させることになり、検出に要する信号を増大させる。すなわち、水晶振動子を用いた場合であれば該水晶振動子上の重量の変化量が大きくなり、検出信号である周波数減少量が增大する。また、電極を用いた場合であれば、電極上の二本鎖DNAの増加により測定に用いる電気化学的な信号が増大する。さらに、標識剤として、核酸の二重鎖にインターカレートする挿入剤、例えばヘキスト33258を用いる場合、本剤はAT配列に結合することが知られているため、AT-richな領域に対してキャリア核酸の配列を設定すればヘキスト33258の結合量を増やすことができ、さらに効果的に測定時の信号が増幅される。また、キャリア核酸として一部あるいは全部が標識剤で標識されているものを用いれば、さらに信号の増幅が期待できる。使用する標識剤は、特に限定されるものではないが、上述した各種の標識剤を好適に用いることができる。以上から、上述した方法により試料から核酸を抽出することにより試料からの核酸の抽出効率を向上させ、該抽出した試料を用いてハイブリダイゼーションにより対象とする核酸の存在を検出する場合には、類似配列の存在による偽陽性を防止するとともに対象とする核酸自身のセルフハイブリダイゼーションを抑制し、測定に要する信号を増大させることが可能となる。

【0048】次に、本願第2~第4の発明による検出装置において、ハイブリダイゼーションを行う際の条件について説明する。

【0049】ハイブリダイゼーションは、通常、イオン強度0.01~5、pH5~10の範囲の緩衝液中で行う。緩衝液中にはハイブリダイゼーションの促進剤である硫酸デキストラン、サケ精子DNAやウシ胸腺DNA

等のキャリア核酸、核酸の分解を防止するためにEDTAおよび界面活性剤等を添加することが可能である。なお、上述したように、ハイブリダイゼーションを行う際にキャリア核酸が混在する場合にはハイブリダイゼーションを阻害する可能性があるためキャリア核酸の添加には慎重を期し、必要に応じて既知の塩基配列からなるキャリア核酸を添加するとよい。一方、試料より抽出した核酸を90℃以上で熱変性させ緩衝液中に混合する。なお、試料より抽出した核酸を90℃以上で熱変性させた後、0℃で急冷して緩衝液中に混合することもできる。反応中は、攪拌又は震盪等の操作を行って反応速度を高めることも可能である。そして、10～90℃の下、1分以上1晩程度の反応時間でハイブリダイゼーションを行う。ところで、上述したように、電極に固定された核酸（プローブ）は、検出対象となる核酸をバックグラウンドを生じることなく確実に検出するために15塩基～3000塩基程度の長さにすることが多い。そして、電極に固定された核酸（プローブ）の塩基配列は、該核酸（プローブ）と検出対象となる核酸とが特異的にハイブリッドを形成することができるよう、検出対象となる核酸に特徴的な塩基配列と相補鎖を形成するように設計する。上述した反応温度は、電極に固定された核酸（プローブ）の塩基配列と検出の対象となる核酸とのホモロジーによって最適値を選択するが、一般に、ハイブリダイゼーションに際する適切な反応温度は、核酸が変性（融解）する温度（ $T_m$ ）より20～25℃低い温度に設定する。ここで、 $T_m$ は、以下の式より算出できる。

【0050】 $T_m = 81.5 + 16.6 (\log_{10} [Ci]) + 0.41 (\% G+C) - 0.63 (\% \text{ formamide}) - (600/n) - 1.5 (\% \text{ mismatch})$

ただし、 $Ci$ は一価の陽イオンの濃度、 $n$ はプローブの塩基数である。

【0051】また、簡便な $T_m$ の算出方法として、以下の計算式を用いることができる。

【0052】 $T_m = 2^\circ C (A+T)\% + 4^\circ C (G+C)\%$ （特に、プローブが18 mer以下の場合）

ハイブリダイゼーションに際し、 $T_m$ より20～25℃低い温度に設定した場合には、反応の平衡がほぼ二本鎖形成側に偏っている。よって、反応時間を長くすることで、特異的なハイブリッドの形成は経時的に多くなっていく。また、特異的なハイブリッドの形成を、電気化学的に促進することも可能である（特開平5-199898）。ハイブリダイゼーションの際、核酸（プローブ）を固定化した電極にプラス電位を印加すると、反応液中のDNAやRNAは負に帯電していることから、DNAやRNAを電極の近傍に引き寄せることができる。そのため、電極に固定化した核酸（プローブ）の近傍においてDNAやRNAの濃度が高くなる。液相中での核酸の検出反応は、1960年にMarmurらによって解析されており（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 46, 456, 1960）、核酸の

濃度に対して2次反応であることが示されている。よって、電極の近傍で核酸の濃度が高くなれば、反応速度は速くなるわけである。すなわち、電気化学的にハイブリダイゼーションを促進することができることになる。なお、本願第4の発明に係る検出装置においては、第1の電極にプラス電位を印加してハイブリダイゼーションを行った後、第2の電極にプラス電位を印加してハイブリダイゼーションを行うようにするとよい。なお、測定時のバックグラウンドを低減させるため、ハイブリダイゼーションを行った後、測定手段により測定を行う前に、電極は緩衝液（例えば、ハイブリダイゼーション溶液）や滅菌した純水等で洗浄することが望ましい。

【0053】

【発明の実施の形態】本願発明の電極およびセンサの構成および作成法、並びに、検出装置の構成について順次説明する。

【0054】（電極の構成）図1および図2は、本願発明のひとつの実施形態にかかる電極の構成を示す上面図（図1（a）および図2（a））およびA-B線で切断した場合の断面図（図1（b）および図2（b））である。図1においては、電極の基礎をなす基板12上に導電体11を形成している。そして、導電体11および基板12の一部に絶縁体14を形成させた後、フォトリソグラフィにより開口して露出した導電体からなる開口部13を形成している。また、図2においては、電極の基礎をなす基板12上に、まず接着層15を形成している。そして、接着層15の上に導電体11を形成させた後、フォトリソグラフィにより開口して露出した導電体からなる開口部13を形成させている。さらに、図3および図4は、本発明の別の実施態様にかかる電極で、一度に一種類以上のプローブを使った検査または数検体に対して一種類のプローブを使って同時に行う検査に使用することが可能な電極である。図3および図4の電極の基本的な構造は、図1または図2に記載の電極と同じであるが、開口部31を複数有しているものである。図3に示した電極においては同一径の開口部31を複数形成し、同一のサンプルが1つの開口部31に対応するようにして核酸を検出する構成であるが、図4に示した電極は定量性を向上させる目的から、2つの径からなる開口部31および開口部32を1つの組とし、同一のサンプルが2つの開口部31および開口部32に対応するようにして核酸を検出する構成である。なお、図4における電極においては、開口部31および開口部32に固定化される核酸（プローブ）の量は当然異なるようになっている。さらに、図5は、本願発明の更に別の実施態様にかかる電極で、開口部51にプローブを固定していない参照電極52を有している、レファレンス電極一体型の電極である。図5に示した電極の基本的な構造は図1または図2に記載の電極と同じであるが、参照電極52には核酸（プローブ）を固定しておらず、図3に示した

電極と同じように開口部51を複数個有している。なお、上述したように、図1～図5における開口部の表面積は、検出限界に基づいて式(1)より設定された表面積、例えば、 $10^5 \text{ copy/mL}$ 以下の核酸の検出を達成する場合には $7 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$ となるように調整されることとはいうまでもない。また、図6は、上記電極を用いた検出装置の一実施形態を示した図である。図6において、61はプローブとなる核酸62を固定化した電極、63は反応槽であり、電源64が電極61および反応槽63を介して回路を形成するように接続されている。また、回路の内部には、電流計65、電圧計66および可変抵抗67が配置されており、反応槽63内でハイブリダイゼーションを行った後に電圧を印加して回路に流れる電流等を測定するように構成されている。なお、反応槽63の内部に保持される溶液は容易に置換することができ、測定時には反応槽63の内部を新鮮なハイブリダイゼーション溶液等で置換することが可能である。図6における検出装置によれば、反応槽63の内部に上述した緩衝液(ハイブリダイゼーション溶液)およびサンプルを保持させ、サンプルと核酸62とをハイブリダイゼーションさせる。このとき、ハイブリダイゼーションの温度および時間は上述したように設定されることが望ましい。次いで、好ましくは、反応槽63および電極61を洗浄し、反応槽63の内部に新鮮な溶液(例えばハイブリダイゼーション溶液)を満たして電源64を動作させ、電流値あるいは電圧値等を電流計65や電圧計66を用いて測定する。そして、測定結果より、サンプル中に含まれる検出対象とした核酸の量(濃度)が算出される。なお、上述したように、各種の標識剤を用いて検出感度をより向上させることが可能である。

【0055】また、図7および図8は、上記電極を用いて完全に自動化された検出装置の一実施態様の構成を示す図である。

【0056】図7および図8において、検出装置は、上記の電極を具備した電極ホルダーと、上記電極および試料を反応させるための、温度可変の反応槽を具備した反応部と、反応(ハイブリダイゼーション)後に電極を洗浄するための、温度可変の洗浄槽を具備した第一洗浄部と、反応(ハイブリダイゼーション)後の洗浄済み電極を挿入剤と反応させるための、温度可変の挿入剤溶液槽を具備した挿入剤反応部と、挿入剤による反応後に電極を洗浄するための、温度可変洗浄槽を具備した第二洗浄部と、挿入剤による反応後の洗浄済み電極の電気化学測定を行うための電気化学的測定部と、前記の電気化学的測定により得たデータを分析するための分析ユニットと、上記の一連の反応(ハイブリダイゼーション)、洗浄、挿入剤による反応、洗浄、電気化学的測定を制御するための操作ユニットと、前記の反応部、第一洗浄部、挿入剤反応部、第二洗浄部、電気化学的測定部を隣接してのせた移動装置とを備えている。なお、上記検出装置

には更に、検出用の試料(検体)を搬入する搬入口と、試料から電極と反応させるための核酸を抽出するための試料調整ユニットと、該搬入口と該試料調製ユニットとの間および該試料調製ユニットと前記反応部との間の、試料の移動を行う搬送ユニットと、前記の反応(ハイブリダイゼーション)、洗浄、挿入剤反応時に生じる廃液を保管する気ための廃棄物保管ユニットとを備えていることが好ましい。

【0057】図7に示した、検出装置70は、上記で説明した電極を保持するための電極固定ホルダ71、反応槽72、第1洗浄槽73、挿入剤反応槽74、第2洗浄槽75および電気化学測定槽76、並びに前記の反応槽72、洗浄槽73、挿入剤反応槽74、洗浄槽75および電気化学測定槽76をのせた移動装置77、並びに分析ユニット78および操作ユニット79を具備している。これらの槽の間での電極の移動は、移動装置77を使って反応槽等を動かすことにより達成される。反応槽72に、予め試料から抽出しておいた核酸の溶液を入れておき、電極固定ホルダ71に固定された本願発明の電極を反応槽72に浸す。次いで、反応槽72中で、核酸の変性工程と、変性した核酸とプローブを固定化した電極とのハイブリダイゼーションを行う工程と、洗浄工程と、挿入剤反応工程と、洗浄工程と、電気化学工程とを順次行う。変性工程では、試料から抽出した核酸を90℃以上98℃以下、好ましくは95℃以上98℃以下に加熱した後、急冷する。次のハイブリダイゼーションを行う工程では、温度を30℃から80℃の間で、 $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 、好ましくは $\pm 0.1^\circ\text{C}$ のレベルで制御して反応を行う。次の第一洗浄槽73では、電極を25℃から80℃の間で温度制御しながら洗浄する。この工程により、非特異的に電極に結合した核酸等を取り除くことができる。次に挿入剤溶液槽74で、洗浄済み電極を25℃から80℃の間の温度で制御して、挿入剤と電極上に形成された二本鎖核酸との反応を行わせる。次の第二洗浄槽75では、電極を25℃から80℃の間で温度制御しながら洗浄する。更に、電気化学測定槽76で、電気的な測定を行う。測定終了後、分析ユニット78に予め記録されている検量線を参考にして試料中の検出対象の核酸(目的遺伝子等)の濃度がアウトプットされる。以上の操作を、それぞれの槽及びユニットと電気的につながれた操作ユニット79を通じて行う。また、図8に示した検出装置80は図7に示した検出装置に加えて、試料搬入口81と、試料調製ユニット83と、該試料搬入口81と該試料調製ユニット83との間、および該試料調製ユニット83と上記した検出装置70との間を結ぶ試料搬送ユニット82、並びに廃棄物保管ユニット87とを備えている。この態様においては、試料を試料搬入口81に入れた後、試料搬送ユニット82を通して試料調製ユニット83に運ばれ、該試料調製ユニット83で核酸の抽出が行われる。抽出された核酸は該試料搬送ユニッ

ト82を通して上記の検出装置70に運ばれて、上述したように核酸の検出が行われる。なお、廃棄物保管ユニット85に、洗浄工程等において生じた廃棄物を一時的に保存する。

【0058】さらに、図9および図10は、本願発明に係るセンサの一実施形態を示した図である。図9および図10において、基板91、基板92、基板101、基板102および基板103上に配置された導電体93、導電体94、導電体104、導電体105および導電体106上には各々核酸（プローブ）95、核酸96、核酸107、核酸108および核酸109が固定化されている。特に、図10によるセンサは、一度に二種類以上のプローブを使った検査に使用することが可能である。図9および図10のセンサにおける電極の基本的な構造は、特に限定はされないが、図1～図4に記載の電極を好適に用いることができる。そして、図9（b）および図10（b）に示したように、検出対象となる核酸110は、核酸110の両端部によって核酸95と核酸96、核酸107と核酸108あるいは核酸107と核酸109との間にまたがるようにハイブリッドを形成する。また、検出対象となる核酸110が核酸95と核酸96、核酸107と核酸108あるいは核酸107と核酸109との間にまたがるようにハイブリッドを形成した場合に、図11に示すように、検出感度を向上させる目的から標識剤により標識した核酸111を検出対象となる核酸110に結合させることもできる。また、図9～図11において、電極上の核酸を固定化した領域の表面積を、検出限界に基づいて式（1）より設定された表面積となるように調整するとより好ましい。さらに、図11に示したように、基板91と基板92との間隙を一定となるように確実に保持するために、基板91と基板92との間にスペーサ112を設けることが好ましい。該スペーサは、電極上に導電体を配置する際にフォトリソグラフィを用いて形成することができる。

【0059】また、図12は、上記センサを用いた検出装置の電気的構成を示した図である。図12において、プローブとなる核酸123および核酸124を固定化した電極121および電極122に対して、電源125が電極121および電極122を介して回路を形成するように接続されている。また、回路の内部には、電流計126、電圧計127および可変抵抗128が配置されており、電極121および電極122を介してハイブリダイゼーションを行った後に電圧を印加して回路に流れる電流値等を測定するように構成されている。さらに、図13は、上記センサを用いた本願発明の検出装置の一実施形態を示した図である。図13においては、電極131および電極132は石英ガラス等からなるキャピラリー133の内部に作り込まれており、キャピラリー133の内部でハイブリダイゼーションが行われる構成になっている。電極131および電極132には電源134

が電極131および電極132を介して回路を形成するように接続されており、回路の内部には、電流計135、電圧計136および可変抵抗137が配置されている。なお、図13における検出装置においては、サンプルの溶液がキャピラリー133の内部を一定方向に流通する構成となっている。そこで、図14に示すように、送液ポンプ141の動作およびサンプルの注入部142からのサンプルの注入のタイミングを調整可能とし、キャピラリー133の内部にサンプルを流通した後、サンプルの溶液の流通を停止してハイブリダイゼーションを行い、ハイブリダイゼーションが終了した後にキャピラリー133の内部を新鮮な溶液が流通するように構成することにより、ハイブリダイゼーション後の電極およびキャピラリー133の内部を容易に洗浄することができる。したがって、測定装置143により、より定量性の高い核酸の検出を行うことができる。なお、測定装置143は、電気化学的な信号を測定する装置あるいは核酸より生じる光子を検出する装置でもよく、また、これらを組み合わせた装置でもよい。また、ハイブリダイゼーション時の温度を正確に制御するために、キャピラリー133の周囲にサーモスタット等により制御されるヒータ等の加熱手段を配置することも可能である。図15は、上記図13および図14に示した構成を適用した検出装置の一実施形態を示した図である。検出装置150は、上記図9および図10に示したセンサを保持するための固定ホルダ151、緩衝液（ハイブリダイゼーション溶液）を保持する溶液タンク152およびサンプルを保持・注入する注入部153を、固定ホルダ151を介してハイブリダイゼーション後の溶液を保存する廃液タンク154と接続する送液ライン155、センサを保持した固定ホルダ151からの信号を測定する測定ユニット156および測定ユニット156より測定された結果を外部に出力するための出力端子157を具備しており、サンプルおよび緩衝液（ハイブリダイゼーション溶液）は送液ポンプ158の駆動力により送液ライン155を介して移動する。溶液タンク152より、送液ライン155を通じ固定ホルダ151に向かって緩衝液（ハイブリダイゼーション溶液）が送液されるが、その過程で、注入部153より、予め試料から抽出しておいた核酸の溶液が混合される。試料から抽出された核酸を混合した緩衝液（ハイブリダイゼーション溶液）が固定ホルダ151に備えたセンサに到達すると、送液ライン155を介した送液は停止され、固定ホルダ151中で、核酸の変性工程と、該変性した核酸とプローブを固定化した電極を有するセンサとの間でハイブリダイゼーションを行う工程とを順次行う。なお、核酸の変性工程は、核酸が固定ホルダ151に到達する以前に行ってもよく、例えば、変性した核酸を注入口153より注入するようにしてもよい。固定ホルダ151においてハイブリダイゼーションが終了すると、送液ライン155を通じて固

定ホルダ151に向かって緩衝液（ハイブリダイゼーション溶液）が再び送液され、固定ホルダ151に備えたセンサを洗浄するとともに、測定ユニット156による電気化学的あるいは光学的な測定が実行される。なお、固定ホルダ151に備えたセンサを洗浄する前に、挿入剤による反応工程を実施してもよい。上述したように、変性工程では、試料から抽出した核酸を90℃以上98℃以下、好ましくは95℃以上98℃以下に加熱した後、急冷する。次のハイブリダイゼーションを行う工程では、温度を30℃から80℃の間で、±0.5℃、好ましくは±0.1℃のレベルで制御して反応を行う。また、固定ホルダ151の洗浄時には、センサを25℃から80℃の間で温度制御しながら洗浄する。そのため、固定ホルダ151の内部には、温度制御が可能な加熱手段が設置されている。さらに、測定ユニット156による電気的あるいは光学的な測定結果は出力端子157より外部に出力され、予め求められている検量線を参考にして試料中の検出対象の核酸（目的遺伝子等）の濃度が算出される。

【0060】（実施形態のまとめ）実施の形態に示された電極、センサおよび検出装置の構成、作用および効果をまとめると次のとおりである。

【0061】（1）実施形態に示された電極（図1～図5）は、基板と、該基板上に配置された導電体と、該導電体の一部の表面を覆って形成された絶縁体と、フォトリソグラフィーにより前記導電体が露出するように該絶縁体に形成された開口部と、該開口部より露出した導電体に固定された核酸（プローブ）とを具備し、該核酸プローブに特異的に結合する所定の配列をもった核酸がプローブに結合したときに生じる電気信号や光学的な信号等を検出できるようになっている。上記電極は、開口部がフォトリソグラフィーによって露出されているために、開口部の面積が検出対象となる核酸の検出限界にあわせて正確に制御されていて、その結果、開口部より露出した導電体上に固定化される核酸（プローブ）の量が正確に制御される。さらに、実施形態に示された電極

（図2）は、基板と導電体との間に接着層を有するものとなっている。該電極においては、電極用の材質としては優れているが、基板との接着性が悪い導電体を使って、より安定で優れた電極を作成することができる。また、実施形態に示された上記電極は、絶縁体に樹脂を用いたものとなっており、樹脂のなかでも好ましくはフォトリソグラフィーまたはフォトレジストを用いたものとなっている。さらに好ましくは、光露光用フォトレジスト、遠紫外用フォトレジスト、X線用フォトレジストおよび電子線用フォトレジストの何れかを用いたものとなっている。上記電極においては、リソグラフィーによるパターンニング後にレジストをそのまま絶縁体として用いることができ、電極作成にあたっての工程を少なくすることが可能である。また、実施形態に示されたセンサ（図9～

図11）は、各々核酸が固定化された2つの電極を有しており、該電極に固定化された核酸を介して検出対象となる核酸がハイブリッドを形成するので、電気的あるいは光学的な測定により核酸を定量性が高く高感度に検出することができる。実施形態に示された電極は、電極の（111）の配向指数を、1以上3以下にしたものとなっており、電極の中でも金を用いたものが好ましい。上記電極においては、電極の（111）面が硫黄原子と相互作用が強いために、チオール化した核酸プローブを効率よく電極に固定化することが可能である。

【0062】（2）実施形態に示された検出装置（図6、図13～図15）は、上述した電極あるいはセンサを用いて核酸の検出が実施される構成をとっているために、検出の対象となる核酸を、電気的あるいは光学的な測定により定量性が高く高感度に検出することができる。また、実施形態に示された検出装置（図7）は、所定の塩基配列を有する核酸を検出するための電極を具備した検出装置であって、電極と試料とを反応させるための、温度可変の反応槽を具備した反応部と、反応（ハイブリダイゼーション）後に電極を洗浄するための、温度可変の洗浄槽を具備した第一洗浄部と、反応後の洗浄済み電極を挿入剤と反応させるための、温度可変の挿入剤溶液槽を具備した挿入剤反応部と、挿入剤との反応後に電極を洗浄するための、温度可変洗浄槽を具備した第二洗浄部と、挿入剤との反応後の洗浄済み電極の電気化学測定を行うための電気化学的測定部と、電気化学的測定により得たデータを分析するための分析ユニットと、前記の一連の反応、洗浄、挿入剤反応、洗浄、電気化学的測定を制御するための操作ユニットと、前記の遺伝子反応部、第一洗浄部、挿入剤反応部、第二洗浄部、電気化学的測定部を隣接してのせた移動装置とを具備したものとなっていて、更に前記の移動装置を用いることで、該電極上の反応、該電極の洗浄、及び該電極の電気化学的測定を順次行って、核酸を電気的、自動的に検出するものとなっている。上記検出装置は、特定配列を有する核酸（遺伝子等）の検出に関わる、電極を使った一連の反応、洗浄等を順次行えるように、反応槽等が移動装置上に隣接してのせられていて、また各反応等を操作、分析するためのユニットが接続されているため、所定の塩基配列を有する核酸の検出を電気的、自動的に行うことが可能である。また、実施の形態に示された自動遺伝子検出装置（図8）は、上記の装置に加えて、試料搬入口と、試料調製ユニットと、該試料搬入口と該試料調製ユニットとの間、および該試料調製ユニットと上記検出装置との間を結ぶ試料搬送ユニット、並びに廃棄物保管ユニットとを備えたものとなっている。該検出装置は、試料から核酸を抽出する試料調整ユニットと、試料搬入から遺伝子検出反応槽間での輸送にかかわる試料搬送ユニットと、廃棄物保管ユニットとを備えているため、試料からの核酸の抽出から核酸の検出反応および分析に至る

までをすべて自動的に連続して、複数の試料に由来する核酸の解析を行うことが可能である。

【0063】

〔実施例〕

〔実施例1〕本実施例では、図2に示された実施の形態に対応する電極を製造した。

【0064】7.62cm(3インチ)のバイレックス(登録商標)ガラス基板12を硫酸・過酸化水素溶液で洗浄した後、電子ビーム法により、まず常法によりチタンを500オングストロームの厚さとなるように蒸着し、次いで同様に金を5000オングストロームの厚さとなるように蒸着した。次に、光露光用フォトレジストAZ4620を用いて蒸着金属のリソグラフィーを行い導電体11を形成した。次いで、同じフォトレジストを塗布し、露光現像して、導電体11を露出させる開口部13(面積:10<sup>-4</sup>cm<sup>2</sup>)を持った電極を形成した。

【0065】次いで、この電極にB型肝炎ウイルス(HBV)の検出用の核酸(プローブ)を固定化(10<sup>12</sup> copy/cm<sup>2</sup>)した。また、比較のために、金ワイヤーを樹脂で抱埋し、本実施例における電極と同一の核酸(プローブ)を固定化(10<sup>12</sup> copy/cm<sup>2</sup>)した電極も同様に使用した。プローブの固定および核酸の検出は、実施の形態に示す方法により実施した。検出実験の結果、金ワイヤー型の電極の場合、ばらつきは変動係数で10~20%であったが、本実施例における電極では変動係数が5%以下であった。

【0066】〔実施例2〕本実施例では、図2に示された実施の形態に対応する電極を作成した。

【0067】7.62cm(3インチ)のHOYA製NA-40基板12を硫酸・過酸化水素溶液で洗浄した後、スパッタリングで、まず常法によりクロムを500オングストロームの厚さとなるように成膜し、次に、同様にして金を5000オングストロームの厚さとなるように成膜した。次いで、光露光用フォトレジストAZ4620を用いてリソグラフィーを行い、接着層15および導電体11を同時に形成した。次いで、同じフォトレジストを塗布し、露光現像して、導電体11を露出させる開口部13(面積:10<sup>-4</sup>cm<sup>2</sup>)を持った電極を形成した。

【0068】次いで、この電極に結核菌の検出用の核酸(プローブ)を固定化(10<sup>12</sup> copy/cm<sup>2</sup>)した。プローブの固定は、実施の形態に示す方法により実施した。また、比較のために、金ワイヤーを樹脂で抱埋し、本実施例における電極と同一の核酸(プローブ)を固定化(10<sup>12</sup> copy/cm<sup>2</sup>)した電極も同様に使用した。

【0069】はじめに、キャリアより喀痰を採取し、フェノールクロロホルム法を用いて核酸の抽出を行った。抽出した核酸は、150mMの塩化ナトリウム、15mMのクエン酸ナトリウム(pH7.0)の溶液に溶解しハイブリダイゼーションに用いた。ハイブリダイゼ

ーションの後、電極を洗浄して挿入剤ヘキスト33258の溶液に浸漬した後、電気化学的な測定を行った。検出実験の結果、金ワイヤー型の電極の場合、ばらつきは変動係数で10~20%であったが、本実施例における電極では変動係数が5%以下であった。

【0070】〔実施例3〕本実施例では、図2に示された実施の形態に対応する電極を作成した。

【0071】7.62cm(3インチ)のSiO<sub>2</sub>(111)およびSiO<sub>2</sub>(100)の基板12上にスパッタリングで、まず常法によりチタンを500オングストロームの厚さとなるように成膜し、次いで同様にして、金を5000オングストロームの厚さとなるように成膜した。そして、各々の基板上の金(111)の配向指数を測定した結果、SiO<sub>2</sub>(111)上では約2、SiO<sub>2</sub>(100)上では約1であった。次に、光露光用フォトレジストAZ4620を用いてリソグラフィーを行い、接着層15および導電体11を同時に形成した。次いで、同じフォトレジストを塗布し、露光現像して、導電体11を露出させる開口部13(面積:10<sup>-4</sup>cm<sup>2</sup>)を持った電極を形成した。

【0072】次いで、この電極にC型肝炎ウイルス(HCV)のRNAを検出するための核酸(プローブ)を固定化(10<sup>12</sup> copy/cm<sup>2</sup>)した。核酸プローブの固定は、実施の形態に示す方法により実施した。

【0073】はじめに、キャリアより血清を採取し、フェノール法を用いてRNAの抽出を行った。抽出した核酸(RNA)は、150mMの塩化ナトリウム、15mMのクエン酸ナトリウム(pH7.0)の溶液に溶解しハイブリダイゼーションに用いた。ハイブリダイゼーションの後、電極を洗浄して挿入剤ヘキスト33258の溶液に浸漬した後、電気化学的な測定を行った。検出実験の結果、SiO<sub>2</sub>(111)基板を備えた電極の変動係数が4%であったのに対し、SiO<sub>2</sub>(100)基板を備えた電極では変動係数が8%であった。以上より、導電体上にプローブを固定化する際には、配向性の高い導電体を用いたほうが再現性に優れることがわかった。

【0074】〔実施例4〕本実施例では、図2に示された実施の形態に対応する電極を作成した。

【0075】7.62cm(3インチ)のアルミナ基板12を硫酸・過酸化水素溶液で洗浄した後、スパッタリングで、まず常法によりチタンを500オングストロームの厚さとなるように成膜し、次に、同様にして金を5000オングストロームの厚さとなるように成膜した。次いで、光露光用フォトレジストAZ4620を用いてリソグラフィーを行い、接着層15および導電体11を同時に形成した。次いで、同じフォトレジストを塗布し、露光現像して、導電体11を露出させる開口部13(面積:10<sup>-4</sup>cm<sup>2</sup>)を持った電極を形成した。

【0076】次いで、この電極にヒト免疫不全症ウイルス(HIV)のenv遺伝子に結合するSK38プロー

ブを固定化 ( $10^{12}$  copy/cm<sup>2</sup>) した。プローブの固定は、実施の形態に示す方法により実施した。また、比較のために、金ワイヤーを樹脂で抱埋し、本実施例における電極と同一の核酸 (プローブ) を固定化 ( $10^{12}$  copy/cm<sup>2</sup>) した電極も同様に使用した。

【0077】はじめに、キャリアより血清を採取し、フェノール法を用いてHIVのRNAの抽出を行った。抽出した核酸 (RNA) は、150mMの塩化ナトリウム、15mMのクエン酸ナトリウム (pH7.0) の溶液に溶解しハイブリダイゼーションに用いた。ハイブリダイゼーションの後、電極を洗浄して挿入剤ヘキスト33258の溶液に浸漬した後、電気化学的な測定を行った。検出実験の結果、金ワイヤー型の電極の場合、ばらつきは変動係数で10~20%であったが、本実施例における電極では変動係数が5%以下であった。

【0078】(実施例5) 本実施例では、図3に示された実施の形態に対応する電極を作成した。

【0079】7.62cm (3インチ) のバイレックス (登録商標) ガラス基板34を硫酸・過酸化水素溶液で洗浄した後、スパッタリングで、まず常法によりチタンを500オングストロームの厚さとなるように成膜し、次いで同様に金を5000オングストロームの厚さとなるように成膜した。次に、光露光用フォトリソ resist AZ4620を用いてリソグラフィーを行い、接着層、導電体およびリード線33のパターンを形成した。次いで同じフォトリソ resist を塗布し、露光現像して、導電体を露出させる開口部31 (面積:  $10^{-4}$ cm<sup>2</sup>) を持ったレジストパターン (絶縁体) を備えた電極を形成した。このリソグラフィーにより、1つの電極上に4つの開口部31を作成した。

【0080】次いで、HBVのサブタイプである、adr、adw、ayrおよびaywの各々にのみ相補的な20塩基の核酸 (プローブ) を、電極上の開口部31にひとつづつ (1対1に) 固定化 ( $10^{12}$  copy/cm<sup>2</sup>) した。プローブの固定は、実施の形態に示す方法により実施した。

【0081】上記の実施例と同様に、キャリアの血清よりHBVに由来する核酸を抽出した。抽出した核酸を、上記プローブとハイブリッドを形成可能な領域を含むようにPCRで増幅した後に、ハイブリダイゼーションを上記と同様に行った。検出実験の結果、該キャリアから採取した血清では、サブタイプ adrに相補的なプローブを固定化した開口部のみににおいて信号が得られた。したがって、1つの電極を用いることで簡単にHBVの遺伝子型を決定することができた。

【0082】(実施例6) 本実施例では、図5に示された実施の形態に対応する電極を作成した。

【0083】7.62cm (3インチ) のバイレックス (登録商標) ガラス基板54を硫酸・過酸化水素溶液で洗浄した後、電子ビーム法により、まず常法によりチタンを500オングストロームの厚さとなるように蒸着

し、次いで同様に金を5000オングストロームの厚さとなるように蒸着した。次に、光露光用フォトリソ resist AZ4620を用いてリソグラフィーを行い、接着層、導電体およびリード線55のパターンを形成した。さらに、CVDで窒化ケイ素膜を2000オングストロームの厚さとなるように成膜して絶縁体53を形成させた。次いで同じフォトリソ resist を塗布し、露光現像して、導電体を露出させる開口部41 (面積:  $10^{-4}$ cm<sup>2</sup>) を持ったレジストパターン (絶縁体) を備えた電極を形成した。このリソグラフィーにより、1つの電極上に4つの開口部51と1つの参照電極52とを作成した。

【0084】次いで、この電極の4つの開口部51より露出した導電体の各々に、B型肝炎ウイルス (HBV) の検出用の核酸 (プローブ) を固定化 ( $10^{12}$  copy/cm<sup>2</sup>) した。プローブの固定および核酸の検出は、実施の形態に示す方法により実施した。検出実験の結果、一度に4検体の検出が可能であり、また、すべてにおいて変動係数が5%以下であった。

【0085】(実施例7) 本実施例では、図3に示された実施の形態に対応する電極を作成した。

【0086】7.62cm (3インチ) のバイレックス (登録商標) ガラス基板34を硫酸・過酸化水素溶液で洗浄した後、銀を5000オングストロームの厚さとなるように成膜し、次に、SiO<sub>2</sub>を5000オングストロームの厚さとなるように成膜して絶縁体32を形成させ、光露光用フォトリソ resist AZP4620を用いてSiO<sub>2</sub>のリソグラフィーを行った。このリソグラフィーにより、1つの電極上に4つの開口部31を作成した。そして、最後に、AZリムーバを用いてレジストを除去した。

【0087】この電極を用いて、実施例5と同様に検出実験を行った。検出実験の結果、該キャリアから採取した血清では、サブタイプ adrに相補的なプローブを固定化した開口部のみににおいて信号が得られた。したがって、1つの電極を用いることで簡単にHBVの遺伝子型を決定することができた。

【0088】(実施例8) 実施の形態に記載の検出装置80を用いて、血清中よりHCVの検出を試みた。電極には、HCVの非翻訳領域に相補的な5'-CCTGTGAGGAAGTACTACTGTC-3'をプローブとして固定した。プローブの固定は、実施の形態に示された方法によって実施した。ハイブリダイゼーションの温度は53℃に設定し、洗浄、ハイブリッドを形成した領域への挿入剤の挿入、分析工程は37℃で制御して行った。その結果、検出装置80に試料をセットした後、約1時間30分でHCVに由来する核酸の濃度を定量することができた。

【0089】(実施例9) 本実施例では、図2に示された実施の形態に対応する電極を製造した。

【0090】7.62cm (3インチ) のバイレックス

ガラス基板12を硫酸・過酸化水素溶液で洗浄した後、電子ビーム法により、まず常法によりチタンを500オングストロームの厚さとなるように蒸着し、次いで同様に金を5000オングストロームの厚さとなるように蒸着した。次に、光露光用フォトレジストAZ4620を用いてリソグラフィーを行い、開口部13の直径が、1mm、0.1mmおよび0.05mmの三種類の電極を作製した。

【0091】次いで、この電極にB型肝炎ウイルス(HBV)の検出用の核酸(プローブ)を実施の形態に示す方法により固定化(順に $10^{12}$  copy/cm<sup>2</sup>、 $10^{11}$  copy/cm<sup>2</sup>および $10^{10}$  copy/cm<sup>2</sup>)した。プローブの固定および核酸の検出は、実施の形態に示す方法により実施した。

【0092】はじめに、キャリアより血清を採取し、フ

ェノールクロロホルム法を用いてHBVに由来する核酸の抽出を行った。抽出した核酸は、150mMの塩化ナトリウム、15mMのクエン酸ナトリウム(pH7.0)の溶液に溶解しハイブリダイゼーションに用いた。ハイブリダイゼーションの後、電極を洗浄して挿入剤ヘキスト33258の溶液に浸漬した後、ヘキスト33258に由来する電気化学的な信号を測定した。なお、ハイブリダイゼーションの際には、電極にプラス0.5Vの電位を生じさせて、ハイブリダイゼーションの反応を促進させた。そして、三種類の電極について検出感度を比較したところ、表1に示す結果となり、開口部の面積が小さい電極で感度が高くなることが分かった。

【0093】

【表1】

開口部の直径(mm)	核酸を固定化する領域の面積(cm <sup>2</sup> )	検出限界(copy/mL)
1	$8 \times 10^{-3}$	$10^6$
0.1	$8 \times 10^{-5}$	$10^5$
0.05	$2 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-4}$

(実施例10)本実施例では、図2に示された実施の形態に対応する電極を作成した。

【0094】7.62cm(3インチ)のHOYA製NA-40基板12を硫酸・過酸化水素溶液で洗浄した後、スパッタリングで、まず常法によりクロムを500オングストロームの厚さとなるように成膜し、次に、同様にして金を5000オングストロームの厚さとなるように成膜した。次いで、光露光用フォトレジストAZ4620を用いてリソグラフィーを行い、接着層15および導電体11を同時に形成した。次いで、同じフォトレジストを塗布し、露光現像して、導電体11を露出させる開口部13を持った電極を形成した。この際、開口部13の形状を円形(直径1.6mm、周囲の長さ0.5c

m、面積0.02cm<sup>2</sup>)、正方形(1.5×1.5mm、周囲の長さ0.6cm、面積0.0225cm<sup>2</sup>)とした2種類の電極を作製した。

【0095】次いで、これらの電極にB型肝炎ウイルス(HBV)の検出用の核酸(プローブ)を固定化( $10^{12}$  copy/cm<sup>2</sup>および $10^{12}$  copy/cm<sup>2</sup>)した。プローブの固定および核酸の検出は、実施の形態に示す方法により実施した。そして、各々の電極について検出感度を比較した。検出実験の結果、表2に示すように、検出感度は各電極でほぼ同じであったが、円形の開口部を備えた電極を用いた場合ばらつきが減少することが分かった。

【0096】

【表2】

開口部の形状	検出限界(copy/mL)	測定結果のばらつき:CV(%)
円形	$10^7$	5
正方形	$10^7$	8

(実施例11)本実施例では、図2に示された実施の形態に対応する電極を作成した。

【0097】7.62cm(3インチ)のHOYA製NA-40基板12を硫酸・過酸化水素溶液で洗浄した後、スパッタリングで、まず常法によりチタンを500オングストロームの厚さとなるように成膜し、次に、同様にして金を5000オングストロームの厚さとなるように成膜した。次いで、光露光用フォトレジストAZ4620を用いてリソグラフィーを行い、接着層15および導電体11を同時に形成した。次いで、同じフォトレジストを塗布し、露光現像して、導電体11を露出させ

る開口部13を持った電極を形成した。この際、開口部13の形状を円形とし、直径が1.0mmおよび0.1mmの2種類の電極を作製した。

【0098】次いで、これらの電極にB型肝炎ウイルス(HBV)の検出用の核酸(プローブ)を固定化( $10^{12}$  copy/cm<sup>2</sup>および $10^{12}$  copy/cm<sup>2</sup>)した。プローブの固定および核酸の検出は、実施の形態に示す方法により実施した。そして、各々の電極について検出感度および測定に必要なサンプル量を比較した。検出実験の結果、表3に示すように、開口部(核酸の固定化領域)の面積が小さい電極で検出感度が高くなるとともに、より少ない



量のサンプルで測定することができた。

【0099】

【表3】

開口部の直径 (mm)	検出限界 (copy/mL)	測定に要するサンプル の量 ( $\mu$ l)
10	$10^8$	200
0.1	$10^5$	10

(実施例12) 本実施例では、図4に示された実施の形態に対応する電極を作成した。

【0100】7.62cm (3インチ) のバイレックスガラス基板12を硫酸・過酸化水素溶液で洗浄した後、電子ビーム法により、まず常法によりチタンを500オングストロームの厚さとなるように蒸着し、次いで同様に金を5000オングストロームの厚さとなるように蒸着した。次に、光露光用フォトレジストAZ4620を用いてリソグラフィを行い、1つの電極上に面積の異なる2つの開口部31 (直径0.5mm、面積 $2 \times 10^{-3} \text{cm}^2$ ) および開口部32 (直径0.05mm、面積 $2 \times 10^{-5} \text{cm}^2$ ) からなる組を2組 (AおよびB) 作製した。

【0101】次いで、この電極にB型肝炎ウイルス (HBV) の検出用の核酸 (プローブ) を実施の形態に示す方法により固定化 (開口部31および開口部32ともに $10^{12} \text{copy/cm}^2$ ) した。プローブの固定および核酸の検出は、実施の形態に示す方法により実施した。なお、A側にはHBVのサブタイプ adrを検出するプローブを、B側にはHBVのサブタイプ ayrに相補的な20塩基のプローブを固定化した。上記の実施例と同様にして、キャリアの血清よりHBVに由来する核酸を抽出した。抽出した核酸に対し、サブタイプ間で共通のプライマーでPCRを行った後に、段階希釈してハイブリダイゼーションを上記と同様に行った。ハイブリダイゼーションの後、電極を洗浄して挿入剤ヘキスト33258の溶液に浸漬した後、ヘキスト33258に由来する電気化学的な信号を測定した。検出実験の結果、adrに相補的なプローブを固定化した開口部からのみポジティブな信号が得られた。したがって、サンプルに含まれたHBVは、adrであることが分かった。また、段階希釈したサンプルを用いた検出実験では、開口部の面積の異なる電極を用いることで、6桁のダイナミックレンジで測定が可能であった。

【0102】(実施例13) 7.62cm (3インチ) のバイレックスガラス基板を硫酸・過酸化水素溶液で洗浄した後、スパッタリングでチタンを500オングストロームの厚さとなるように成膜し、次いで同様に金を5000オングストロームの厚さとなるように成膜した。次に、光露光用フォトレジストAZ4620を用いてリソグラフィを行ない、1つの電極上に面積の異なる2つの開口部 (直径0.5mm、面積 $2 \times 10^{-3} \text{cm}^2$ ; 直径0.05mm、面積 $2 \times 10^{-5} \text{cm}^2$ ) を備えた電極を作製

した。次いで、この電極の開口部より露出した導電体にB型肝炎ウイルス (HBV) の検出用の核酸 (プローブ) を実施の形態に示す方法により固定化 (2つの開口部ともに $10^{12} \text{copy/cm}^2$ ) した。

【0103】そして、キャリアより血清を採取し、フェノールクロロホルム法を用いてHBVに由来する核酸の抽出を行った。抽出した核酸は、150mMの塩化ナトリウム、15mMのクエン酸ナトリウム (pH7.0) の溶液に溶解しハイブリダイゼーションに用いた。ハイブリダイゼーションの後、電極を洗浄して挿入剤ヘキスト33258の溶液に浸漬し、ヘキスト33258に由来する蛍光を測定して検出感度を比較した。その結果、1時間程度では両者の間でS/N比に差は認められなかったが、時間の経過とともに直径0.05mmの開口部の領域において蛍光強度のS/Nが向上し、24時間後には、直径0.5mmの開口部の領域におけるS/Nの約3倍にまで向上した。また、検出感度は直径0.5mmの開口部の領域では $5 \times 10^6 \text{copy/mL}$ が限界であったが、0.05mmの開口部の領域では $10^6 \text{copy/mL}$ が限界であった。以上から、光学的な信号を検出する場合も、プローブを固定化する領域の面積が小さい方が検出感度が高いことがわかった。(実施例14) 本実施例では、図11に示された実施の形態に対応する電極を備えたセンサを作成した。

【0104】 $2 \times 2 \text{cm}$  のバイレックスガラス基板91および92を硫酸・過酸化水素溶液で洗浄した後、スパッタリングで、該バイレックスガラス基板91および92上に直径2mmの金からなる電極94および電極93を作製した。そして、電極93にはHBVのサブタイプ間で共通の配列 (チオール標識-ACCTCTCTCAATTTTCTAGG) からなる核酸をプローブ95として固定化 ( $10^{12} \text{copy/cm}^2$ ) し、電極94には別の共通配列 (チオール標識-CGTCCCGTCGGCGCTGAATC) からなる核酸をプローブ96として固定化 ( $10^{12} \text{copy/cm}^2$ ) した。なお、電極93および電極94において、プローブを固定化した領域の面積は $10^{-2} \text{cm}^2$  である。次に、電極93および電極94間に厚さ2000オングストロームのスペーサー112を挟んで、電極93および電極94間の距離を一定 (2000オングストローム) に固定した。また、プローブ95およびプローブ96の固定、および核酸の検出は、実施の形態に示す方法により実施した。はじめに、キャリアより

血清を採取し、フェノールクロロホルム法を用いてHBVに由来する核酸の抽出を行った。抽出した核酸は、150mMの塩化ナトリウム、15mMのクエン酸ナトリウム(pH7.0)の溶液に溶解してサンプルとした。次に、電極93および電極94の間に熱変性した該サンプルを、1000 $\mu$ l/hrの流量で流して1時間のハイブリダイゼーションを行った後、電極93および電極94を超純水で十分に洗浄した。次いで、電極93および電極94の間を超純水で満たして電気伝導度を測定し、HBVの検出を行った。なお、HBVの検出は、段階希釈した複数のサンプルを用いて行った。その結果、電極93および電極94の間の電気伝導度とHBVのDNAの濃度はほぼ比例関係にあることが確かめられた。したがって、電極間の電気伝導度の測定によりHBVのDNAの濃度を定量できることが確認された。

【0105】(実施例15) 2 $\times$ 4cmおよび2 $\times$ 2cmのパイレックスガラス基板101および102、103を硫酸・過酸化水素溶液で洗浄した後、スパッタリングで、該パイレックスガラス基板101、102および103上に直径2mmの金からなる電極104、105および106を作製した。そして、電極104にはHBVのサブタイプ間で共通の配列(チオール標識-ACCTCTCTCAATTTTCTAGG)からなる核酸をプローブ107として固定化(10<sup>12</sup> copy/cm<sup>2</sup>)した。一方、電極105にはHBVのサブタイプ ayrに選択的な配列(チオール標識-CGTCCCGTCGGCGCTGAATC)を固定化(10<sup>12</sup> copy/cm<sup>2</sup>)し、電極106にはHBVのサブタイプ adwに選択的な配列(チオール標識-CGTCCCGTCGGCGCTGAATC)を固定化(10<sup>12</sup> copy/cm<sup>2</sup>)して、図10に示すような構成を備えたセンサを作成した。次に、電極104および電極105、電極104および電極106間に厚さ2000Åのスペーサーを挟んで、電極104および電極105、電極104および電極106の間の距離を一定(2000Å)に固定した。また、プローブ95およびプローブ96の固定、および核酸の検出は、実施の形態に示す方法により実施した。次に、電極104および電極105、電極104および電極106の間に、実施例14と同様にして得たサンプルを熱変性して1000 $\mu$ l/hrの流量で流通させ、1時間のハイブリダイゼーションを行った。なお、ハイブリダイゼーションの工程を通じ、電極104、電極105および電極106を各々30分ずつ正に帯電させるようにした。そして、電極104、電極105および電極106を超純水で十分に洗浄した。次いで、電極104および電極105、電極104および電極106の間を超純水で満たして電気伝導度を測定し、HBVの検出を行った。その結果、電極104と電極105との間では電気伝導度が低下したが、電極104と電極106との間では電気伝導度に変化がなかった。よって、上記サンプルに含まれ

るHBVは、 ayr型であることが確認された。

【0106】(実施例16) 本実施例では、図11に示された実施の形態に対応する電極を備えたセンサを作成した。

【0107】2 $\times$ 2cmのパイレックスガラス基板91および92を硫酸・過酸化水素溶液で洗浄した後、スパッタリングで、該パイレックスガラス基板91および92上に直径2mmの金からなる電極94および93を作製した。そして、電極93にはHBVのサブタイプ間で共通の配列(チオール標識-ACCTCTCTCAATTTTCTAGG)からなる核酸をプローブ95として固定化(10<sup>12</sup> copy/cm<sup>2</sup>)し、電極94には別の共通配列(チオール標識-CGTCCCGTCGGCGCTGAATC)からなる核酸をプローブ96として固定化(10<sup>12</sup> copy/cm<sup>2</sup>)した。なお、電極93および電極94において、プローブを固定化した領域の面積は10<sup>-2</sup>cm<sup>2</sup>である。次に、電極93および電極94間に厚さ2000Åのスペーサー112を挟んで、電極93および電極94間の距離を一定(2000Å)に固定した。また、プローブ95およびプローブ96の固定、および核酸の検出は、実施の形態に示す方法により実施した。

【0108】次に、電極93および電極94の間に熱変性した該サンプルおよびリシゲニンで標識したプローブ111を、1000 $\mu$ l/hrの流量で流して1時間のハイブリダイゼーションを行った後、電極93および電極94を超純水で十分に洗浄した。そして、電極93および電極94の間に電圧を印加して発生した発光強度を測定し、HBVの検出を行った。なお、HBVの検出は、段階希釈した複数のサンプルを用いて行った。その結果、測定された発光強度とHBVのDNAの濃度はほぼ比例関係にあることが確かめられた。したがって、発光強度の測定によりHBVのDNAの濃度を定量できることが確認された。

【0109】(実施例17) 本実施例では、図11に示された実施の形態に対応する電極を備えたセンサを作成した。

【0110】2 $\times$ 2cmのパイレックスガラス基板91および92を硫酸・過酸化水素溶液で洗浄した後、スパッタリングで、該パイレックスガラス基板91および92上に直径2mmの金からなる電極94および電極93を作製した。そして、電極93にはHBVのサブタイプ間で共通の配列(チオール標識-ACCTCTCTCAATTTTCTAGG)からなる核酸をプローブ95として固定化(10<sup>12</sup> copy/cm<sup>2</sup>)し、電極94には別の共通配列(チオール標識-CGTCCCGTCGGCGCTGAATC)からなる核酸をプローブ96として固定化(10<sup>12</sup> copy/cm<sup>2</sup>)した。なお、電極93および電極94において、プローブを固定化した領域の面積は10<sup>-2</sup>cm<sup>2</sup>である。次に、電極93および電極94間に厚さ2

000オングストロームのスペーサー112を挟んで、電極93および電極94間の距離を一定(2000オングストローム)に固定した。また、プローブ95およびプローブ96の固定、および核酸の検出は、実施の形態に示す方法により実施した。次に、電極93および電極94の間に熱変性した実施例14と同様のサンプルおよびフィロセンで標識したプローブ111を、1000 $\mu$ L/hrの流量で流して1時間のハイブリダイゼーションを行った後、電極93および電極94を超純水で十分に洗浄した。次いで、電極93および電極94の間を超純水で満たして電圧を印加するとともに銀/塩化銀電極(参照電極)を電極93および電極94間の超純水中に挿入し、フェロセン由来の電流値を測定してHBVの検出を行った。その結果、作用極(電極93および電極94)で得られるフェロセン由来の電流値とHBVのDNAの濃度はほぼ比例関係にあることが確かめられた。したがって、電極間に流れる電流値の測定によりHBVのDNAの濃度を定量できることが確認された。

【0111】(実施例18)本実施例では、図11に示された実施の形態に対応する電極を備えたセンサを作成した。

【0112】2 $\times$ 2cmのバイレックスガラス基板91および92を硫酸・過酸化水素溶液で洗浄した後、スパッタリングで、該バイレックスガラス基板91および92上に直径2mmの炭素からなる電極94および93を作製した。そして、電極93および94の表面を3-アミノプロピトリエトキシシランで処理した後、電極93にはHBVのサブタイプ間で共通の配列(アミノ基- $\text{ACTTCTCTCAATTTTCTAGG}$ )からなる核酸をプローブ95として固定化( $10^{13}$  copy/ $\text{cm}^2$ )し、電極94には別の共通配列(アミノ基- $\text{CGTCCCGTCCGGCGCTGAATC}$ )からなる核酸をプローブ96として固定化( $10^{13}$  copy/ $\text{cm}^2$ )した。なお、電極93および電極94において、プローブを固定化した領域の面積は10 $\text{-cm}^2$ である。次に、電極93および電極94間に厚さ2000オングストロームのスペーサー112を挟んで、電極93および電極94間の距離を一定(2000オングストローム)に固定した。また、プローブ95およびプローブ96の固定、および核酸の検出は、グルタルアルデヒドの共存下および実施の形態に示す方法により実施した。

【0113】次に、電極93および電極94の間に熱変性した実施例14と同様のサンプルを1000 $\mu$ L/hrの流量で流して1時間のハイブリダイゼーションを行った後、電極93および電極94を超純水で十分に洗浄した。次いで、電極93および電極94の間を超純水で満たし、該超純水中に白金電極(対極)および銀/塩化銀電極(参照電極)を挿入して電極93および電極94(作用極)間に電圧を印加した。そして、核酸から生じる微弱な発光を測定してHBVの検出を行った。その結

果、核酸から生じる微弱な発光とHBVのDNAの濃度はほぼ比例関係にあることが確かめられた。したがって、核酸から生じる微弱な発光の測定によりHBVのDNAの濃度を定量できることが確認された。

【0114】次に、核酸の抽出効率の向上と偽陽性を呈することなく高感度に核酸の検出を実行した実施例について詳述する。

【0115】(実施例19)B型肝炎の患者に由来するパネル血清および健常者(ノンキャリア)に由来するHBV未感染血清の各々1mLに、プロテイナーゼKおよび界面活性剤(0.5% SDS)を作用させ、ウイルスの外殻を壊してDNAを露出させた後、各々に5~100merからなる合成核酸(poly A)を100ng/mLとなるように添加し、フェノール・クロロホルム法を用いてDNAの抽出を行った。抽出したDNAをアルカリ変性させた後、ニトロセルロース膜にブロットし、RIでラベルしたプローブ(HBVのX領域に相補的な5'- $\text{CGTCCCGTCCGGCGCTGAATC}$ -3')を用いてドットブロット法による検出を行った。また、コントロールとして、牛胸腺DNAを添加して抽出したDNAおよびキャリア核酸を未添加で抽出したDNAを用いて同様の操作を行った。なお、上記血清においては、ウイルス量は既知であり、低濃度から高濃度までのウイルス量を示す複数の血清が用意されていた。

【0116】操作の結果、高濃度のウイルス量を示す血清に対しては、上記いずれの方法でも同等の強度のスポットをフィルム上に確認することができたが、低濃度のウイルス量を示す血清に対しては、キャリア核酸を未添加で抽出したDNAにおいてシグナルの強度が弱かった。また、HBV未感染血清については、合成核酸(poly A)を添加してDNAの抽出を行った場合には全くスポットが見られなかったが、牛胸腺DNAを添加してDNAの抽出を行った場合には弱くスポットが見られ、低濃度のウイルス量を示す血清のスポットとの区別がつかなかった。

【0117】以上のことから、キャリア核酸を添加することで、存在量の少ない(低濃度)核酸も効率よく抽出できることが確かめられた。また、牛胸腺DNAをキャリア核酸として用いた場合には、わずかながらプローブとの間で反応を起こし(ハイブリッドの形成)、HBV未感染血清を陽性と判定してしまう危険性が示された。これは、キャリアDNAにHBVに類似の塩基配列が存在するためと推測される。また、キャリアDNAとしてpoly Aを用いた場合には、偽陽性の危険性はないことが確認された。

【0118】(実施例20)HBV-DNAをプラスミドpSP 65に組み込んで作製したpYRB 259を用いて以下のようなモデル実験を行った。

【0119】マイクロタイタープレートにHBVのX領域に相補的なプローブ(5'- $\text{CGTCCCGTCCGG}$

CGCTGAATC-3')を吸着させた後、紫外線を照射して、マイクロタイタープレートにプローブを固定化( $10^{12}$  copy/cm<sup>2</sup>)した。一方、ターゲットとしてピオチンでラベルしたpYRB 259を作製した。次に、ピオチン化したpYRB 259を100 ng/mLとなるように、また、キャリア核酸としてHBV-DNAに相補的な配列を備えた合成オリゴマー(5'-ACTTCTCTCAATTTTCTAGG-3'、5'-CGTCGCAGAA GATCTCAATC-3'、5'-TCGTGTTCAGGCGGGGTTT-3'および5'-CGAACCACTGAACAAATGGC-3')を各々1 ng/mLとなるようにハイブリダイゼーション溶液(150 mmol/Lの塩化ナトリウム、15 mmol/Lのクエン酸ナトリウム、pH 7.0)に溶解し、熱変性させた後、プローブを固定化したプレートのウェルに100  $\mu$ lずつ入れ、43℃で1時間ハイブリダイゼーションを行った。

【0120】次に、ハイブリダイゼーションを行った後、反応液中に残存するpYRB 259の量およびプレート上のプローブとハイブリッドを形成したpYRB 259の量を、ウサギ抗ピオチン抗体およびHRP標識抗ウサギIgG抗体を用いて免疫化学的に測定した。また、コントロールとして、合成オリゴマーを添加しない場合についても、同様の操作を行った。

【0121】その結果、表4に示す通り、合成オリゴマーを添加した場合には、マイクロタイタープレート上のプローブとハイブリッドを形成したターゲット(pYRB 259)の量は、合成オリゴマーが未添加であったコントロールと比較して約2.6倍、反応液中に残存するターゲット(pYRB 259)の量は、合成オリゴマーが未添加であったコントロールと比較して約3分の1であった。

【0122】

【表4】

プレートに固定化されたプローブと ハイブリダイゼーション溶液		
ハイブリダイズしたターゲットの量		に残存したターゲットの量
	(A <sub>415</sub> )	(A <sub>415</sub> )
オリゴマーを		
添加した場合	1.86	0.53
オリゴマーが		
無添加の場合	0.70	1.62

以上から、キャリア核酸の添加によって、ターゲット自身のセルフハイブリダイゼーションが抑制され、ターゲットがマイクロタイタープレート上のプローブとハイブリッドを形成する効率が向上することが確認された。

【0123】(実施例21) ATカット、振動周波数9 MHz、電極面積0.196 cm<sup>2</sup>、電極材料が金である水晶振動子にHBVのX領域に相補的な5'-CGTCCCGTCGCGCTGAATC-3'をチオール基を介して固定化し、HBV-DNA検出センサを作製した。ターゲットとしてpYRB 259およびキャリア核酸としてプラスミドpSP 65の超音波分解物をそれぞれ100 ng/mLとなるようハイブリダイゼーション溶液(150 mmol/Lの塩化ナトリウム、15 mmol/Lのクエン酸ナトリウム、pH 7.0)に溶解し、該溶液の5 mLを熱変性させた後に上記の水晶振動子を該溶液に挿入し、43℃で1時間ハイブリダイゼーションを行った。一方、コントロールとして、pSP 65の超音波分解物を添加しない場合についても同様の操作を行った。

【0124】その結果、pSP 65の超音波分解物を添加しなかった場合には、水晶振動子の振動数の減少量は約100 Hzであったが、pSP 65の超音波分解物を添加した場合では水晶振動子の振動数の減少量は約350 Hzであった。この結果は、水晶振動子上のプローブとハイブリッ

ドを形成したpYRB 259に対して、さらに、pSP 65の超音波分解物がハイブリダイズしたために、水晶振動子の振動数の変化量が増大したことを示しており、キャリア核酸の添加により検出信号が増大することが確認された。

【0125】(実施例22) 本実施例では、図2に示された実施の形態に対応する電極を製造した。

【0126】7.62 cm(3インチ)のパイレックス(登録商標)ガラス基板12を硫酸・過酸化水素溶液で洗浄した後、スパッタリングにより、まず常法によりチタンを500オングストロームの厚さとなるように成膜し、次いで同様に金を5000オングストロームの厚さとなるように成膜した。次に、光露光用フォトレジストAZ4620を用いて蒸着金属のリソグラフィーを行い導電体11を形成した。次いで、同じフォトレジストを塗布し、露光現像して、導電体11を露出させる開口部13(面積:0.07 cm<sup>2</sup>)を持った電極を形成した。

【0127】次いで、この電極に、プローブとしてB型肝炎ウイルス(HBV)のX領域に相補的な核酸(5'-CGTCCCGTCGCGCTGAATC-3')をチオール基を介して固定化( $10^{12}$  copy/cm<sup>2</sup>)した。

【0128】次に、ターゲットとしてpYRB 259およびキャリア核酸としてプラスミドpSP 65の超音波分解物をそれぞれ $10^3$  copy/mLとなるようハイブリダイゼーション

溶液(150mmol/Lの塩化ナトリウム、15mmol/Lのクエン酸ナトリウム、pH7.0)に溶解し、該溶液の100 $\mu$ Lを加熱してDNAを熱変性させた後に上記の電極を該溶液中に入れ、43℃で1時間ハイブリタイゼーションを行った。そして、ハイブリダイゼーションを行った後、電極を洗浄して挿入剤ヘキスト33258の溶液に浸漬した後、電気化学的な測定を行った。一方、コントロールとして、pSP 65の超音波分解物を添加しない以外は上記の場合と同様にして操作を行った。

【0129】その結果、ヘキスト33258に由来する電流値は、pSP 65の超音波分解物を添加した場合には、pSP 65の超音波分解物を添加しないコントロールと比較して5nAの有意な差が認められた。この結果は、電極上のプローブにハイブリダイズしたpYRB 259にさらにpSP 65の超音波分解物がハイブリダイズしたために、ヘキスト33258の結合量が増大したことを示しており、キャリア核酸の添加により検出信号が増大することが確認された。

【0130】(実施例23)本実施例では、図2に示された実施の形態に対応する電極を製造した。

【0131】7.62cm(3インチ)のバイレックス(登録商標)ガラス基板12を硫酸・過酸化水素溶液で洗浄した後、電子ビーム法により、まず常法によりチタンを500オングストロームの厚さとなるように蒸着し、次いで同様に金を5000オングストロームの厚さとなるように蒸着した。次に、光露光用フォトレジストAZ4620を用いてリソグラフィーを行い、接着層15および導電体11を同時に形成した。さらに、CVDにより窒化ケイ素膜を2000オングストロームの厚さとなるように成膜して絶縁体14を形成させた。次いで同じフォトレジストを塗布し、露光現像して、導電体を露出させる開口部13(面積:0.07cm<sup>2</sup>)を持ったレジストパターン(絶縁体)を備えた電極を形成した。

【0132】次いで、この電極の開口部13に露出した導電体上に、プローブとしてHBVのX領域に相補的な塩基配列5'-CGTCCCGTCGGCGCTGAATC-3'を持つ核酸を、チオール基を介して固定化した。

【0133】一方、B型肝炎の患者に由来する血清500 $\mu$ LをプロテイナーゼKおよび界面活性剤(0.5% SDS)で処理した後、キャリア核酸として5~100merからなる合成核酸(poly A)およびHBVに相補的な塩基配列である合成オリゴマー(5'-ACTTCTCTCAATTTTCTAGG-3'、5'-CGTCGCAGAAGATCTCAATC-3'、5'-TCGTGTTACAGGCGGGGTTT-3'および5'-CGAACCCTGAACAAATGGC-3')を各々0.1ng/mLとなるように添加し、フェノール・クロロホルム法を用いてDNAの抽出を行った。そして、抽出したDNAをハイブリダイゼーション溶液(1

50mmol/Lの塩化ナトリウム、15mmol/Lのクエン酸ナトリウム、pH7.0)500 $\mu$ Lに溶解し、該溶液の100 $\mu$ Lを加熱してDNAを熱変性させた後に上記の電極を溶液中に入れ、43℃で1時間ハイブリタイゼーションを行った。そして、ハイブリダイゼーションを行った後、電極を洗浄して挿入剤ヘキスト33258の溶液に浸漬した後、電気化学的な測定を行った。さらに、コントロールとして、キャリア核酸を添加しない以外は上記の場合と同様にして操作を行った。一方、検量線用のサンプルとして、既知濃度のHBV-DNAを血清抽出液(正常人血清で同様の抽出操作を経たもの)で希釈し、前述のキャリア核酸を加えたものを用いて同様に測定した。

【0134】その結果、キャリア核酸の添加を行わなかったコントロールにおいては、図16のBに示すように検量線の直線範囲が10<sup>5</sup>~10<sup>7</sup>copy/mLであるため、検量線の上限あるいは下限をはずれるサンプルが多く存在したが、キャリア核酸を添加した場合には、図16のAに示すように検量線の直線範囲が10<sup>3</sup>~10<sup>8</sup>copy/mLと広がったため、HBV-DNAを検出可能な範囲(コピー数)が拡大し、この範囲からはずれるサンプルは著しく減少した。したがって、キャリア核酸を添加することにより、検出限界の顕著な向上が達成されることが確認された。なお、上述したすべての電極は、90℃以上の熱水処理、あるいは0.2mol/L程度以上のアルカリ溶液処理あるいは尿素等の変性剤による処理で簡単に再生することができ、繰り返して使用することが可能である。

【0135】

【発明の効果】以上詳述したように、本願第1の発明に係る電極によれば、基板上に配置した導電体を被覆した絶縁体の一部に、導電体が露出するように開口部を設け、該開口部より露出した導電体に核酸を固定化したことにより、表面積が制御された導電体上へ核酸を固定化することができる。また、基板上に導電体を配置したことにより、導電体の特性を制御することができる。プローブを固定化する電極の表面積及び結晶構造を制御することができる。したがって、優れた再現性および定量性を発揮し、経済的に核酸を検出可能な電極を提供することができる。

【0136】また、本願第2の発明に係る検出装置によれば、電極に定量的に固定化した第1の核酸と第2の核酸とを反応部でハイブリダイゼーションさせ、第1の核酸に電圧を印加して生じた信号を測定することにより該信号の測定量と第2の核酸の量とを一義的に対応させることができ、また、検出に要する時間の短縮と操作性の向上が達成される。したがって、核酸の検出に際し、優れた再現性および定量性を発揮するとともに、検出に要する時間の短縮と操作性の向上が図られた、検出時の経済性にも優れる検出装置を提供することができる。

【0137】さらに、本願第3の発明に係る検出装置によれば、第2の核酸の検出に必要な最小の面積を有する領域内に定量的に固定化した第1の核酸と第2の核酸とを反応部でハイブリダイゼーションさせ、第1の核酸に電圧を印加して生じた信号を測定することにより、該信号の測定量と第2の核酸の量とを一義的に対応させるとともにバックグラウンドを低減することができ、検出に要する時間の短縮と操作性の向上を達成することができる。したがって、核酸の検出に際し、優れた再現性および定量性を発揮するとともに、検出感度の高感度化が達成され、検出に要する時間の短縮と操作性の向上が図られた、検出時の経済性にも優れる検出装置を提供することができる。

【0138】また、本願第4の発明に係る検出装置によれば、第1および第2の核酸を固定化した第1および第2の電極を該第1および前記第2の核酸に対して第3の核酸がハイブリッドを形成できるように配置し、第1および第2の電極に接続された電源より電圧を印加して生じた信号を測定することにより、第3の核酸に由来する信号をバックグラウンドを低減しつつ確実に得ることができる。したがって、核酸の検出に際し、優れた再現性および定量性を発揮するとともに、検出感度の高感度化が達成され、検出に要する時間の短縮と操作性の向上が図られた、検出時の経済性にも優れる検出装置を提供することができる。

【0139】また、本願第5の発明に係る検出装置によれば、第1および第2の核酸を固定化した第1および第2の電極を、第1および第2の核酸に対して第3の核酸がハイブリッドを形成できるように配置したことにより、第3の核酸は第1および第2の核酸に対して安定したハイブリッドを容易に形成することができる。したがって、核酸の検出に際し、優れた再現性および定量性を発揮するとともに、検出感度の高感度化が達成され、検出に要する時間の短縮と操作性の向上が図られた、検出時の経済性にも優れるセンサを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一つの実施形態にかかる電極の概略図。

【図2】本発明の一つの実施形態にかかる電極の概略図。

【図3】本発明の別の実施形態にかかる電極の概略図。

【図4】本発明の別の実施形態にかかる電極の概略図。

【図5】本発明の更に別の実施形態にかかる電極の概略図。

【図6】本発明に係る電極を用いた検出装置の一実施態様を示した図。

【図7】本発明に係る電極を用いて完全に自動化された検出装置の一実施態様の構成を示した図。

【図8】本発明に係る電極を用いて完全に自動化された検出装置の一実施態様の構成を示した図。

【図9】本発明に係るセンサの一実施態様を示した図。

【図10】本発明に係るセンサの一実施態様を示した図。

【図11】本発明に係るセンサの一実施態様を示した図。

【図12】本発明に係るセンサを用いた検出装置における電気的構成の一実施態様を示した図。

【図13】本発明に係るセンサを用いた検出装置を模式的に示した図。

【図14】本発明に係るセンサを用いた検出装置を模式的に示した図。

【図15】本発明に係るセンサを用いた検出装置の一実施態様を示した図。

【図16】実施例2.3におけるHBV-DNAの検出限界を示した図。

【符号の説明】

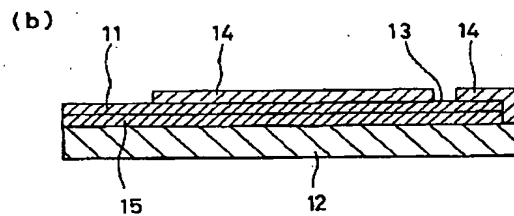
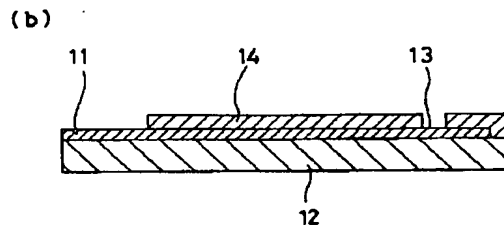
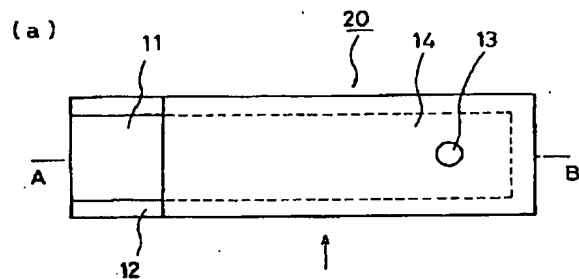
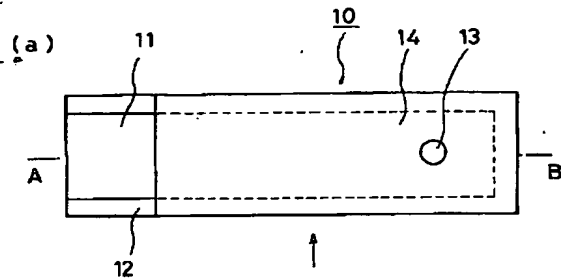
10、20、30、40、50、61、131、132  
……電極  
11、93、94、104、105、106……導電体  
12、35、54、91、92……基板  
101、102、103、121、122……基板  
13、31、32、51……開口部  
14、33、53……絶縁体 15……接着層  
34、55……リード線 52……参照電極  
62、95、96、107、108、109、110……核酸  
63……反応槽 64、125……電源  
65、126、135……電流計 66、127、136……電圧計  
67、128、137……可変抵抗 68……対極  
70、80、150……検出装置 71……電極固定ホルダ  
72……反応槽 73……第1洗浄槽 74……挿入剤溶液槽  
74……挿入剤溶液槽 75……第2洗浄槽 76……電気化学測定槽  
77……移動装置 78……分析ユニット 79……操作ユニット  
81……試料搬入口 82……試料搬送ユニット  
83……試料調製ユニット 84……制御ユニット  
85……廃棄物保管ユニット 86……廃液保管ユニット  
87……試薬供給ユニット 88……分析ユニット  
112……スパーサ  
133……キャピラリー 141、158……送液ポンプ  
142、153……注入部 143……測定装置  
144、152……溶液タンク 145、154……廃液タンク  
151……固定ホルダ 155……送液ライン 1

56……測定ユニット

157……出力端子

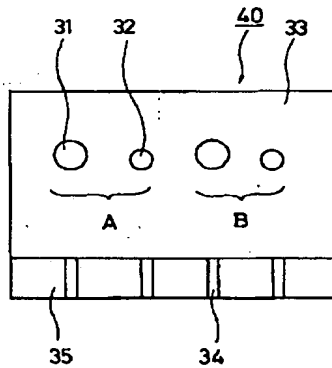
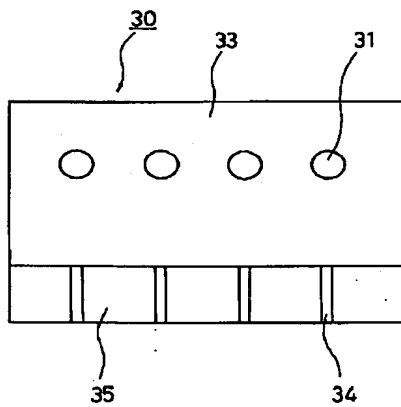
【図1】

【図2】



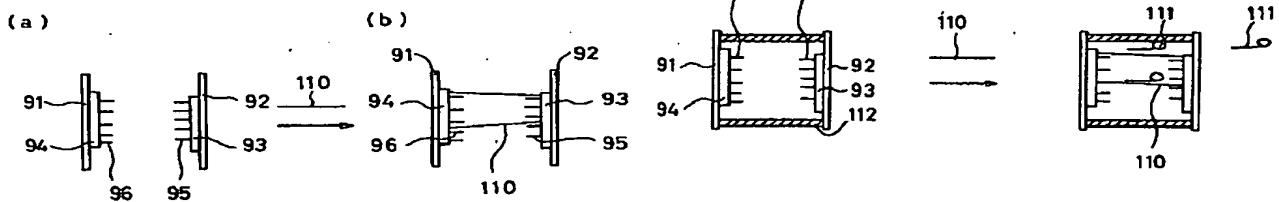
【図3】

【図4】

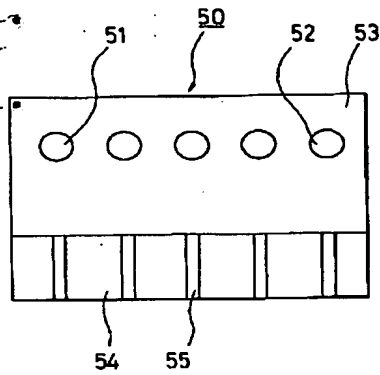


【図9】

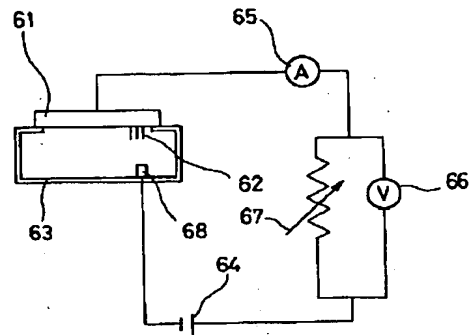
【図11】



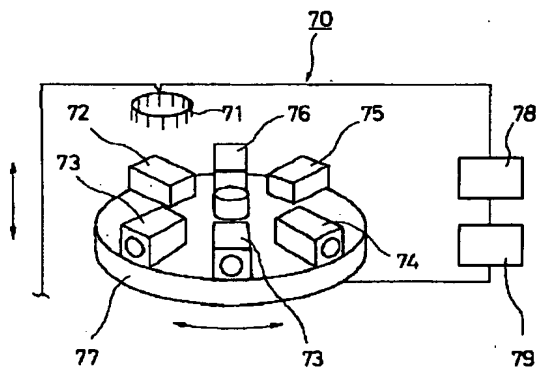
【図5】



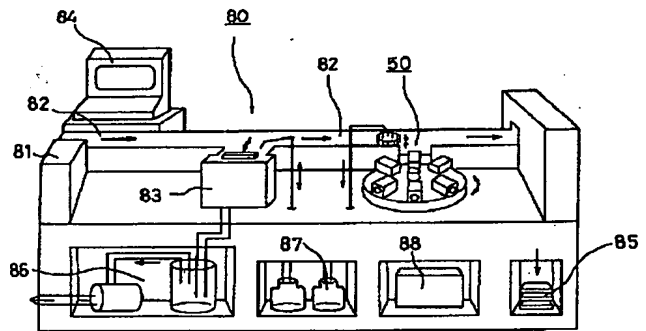
【図6】



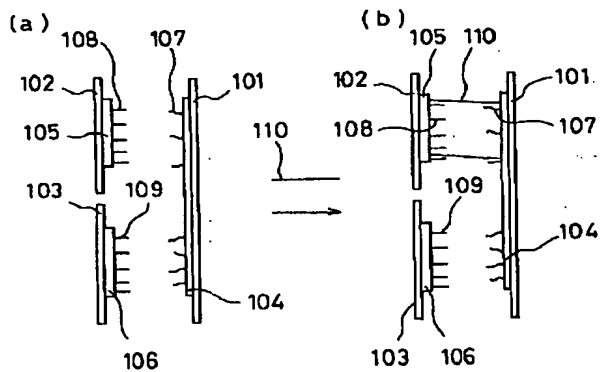
【図7】



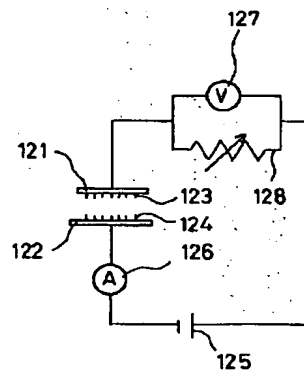
【図8】



【図10】

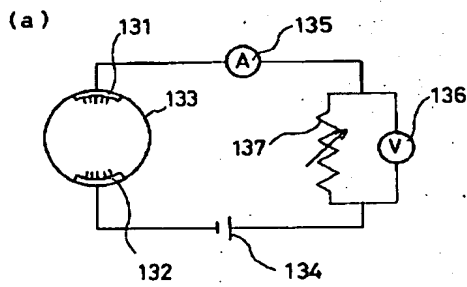


【図12】

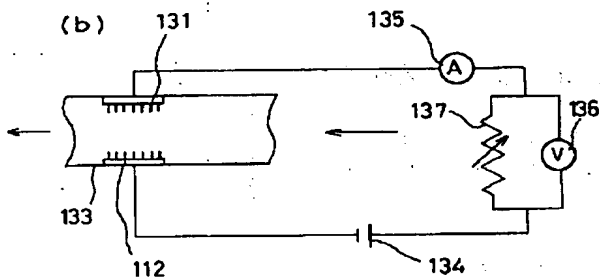
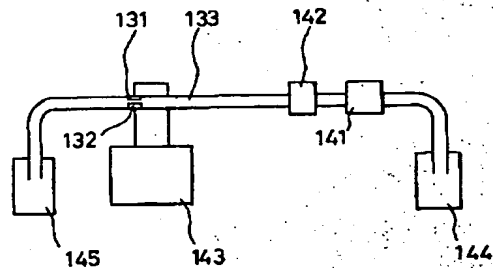




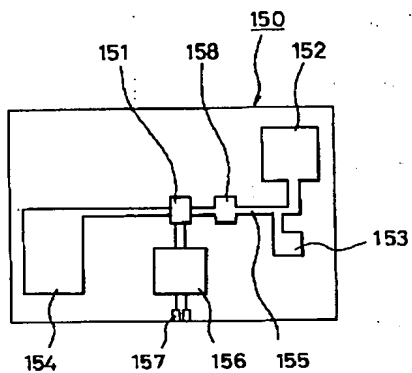
【図13】



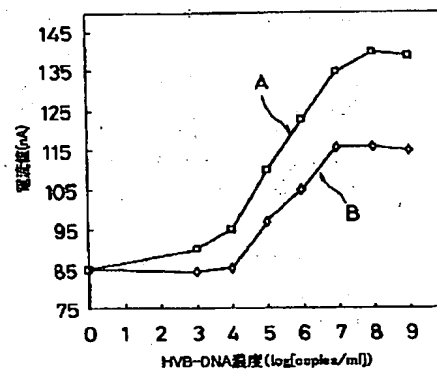
【図14】



【図15】



【図16】



フロントページの続き

(72) 発明者 石森 義雄  
神奈川県川崎市幸区小向東芝町1番地 株  
式会社東芝研究開発センター内